

Etablierung eines parallelen immunologischen Nachweises von Drogen in Serum

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc. Sarah Schumacher

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
2. PD Dr. Harald Seitz
3. Prof. Dr. med. Rudolf Tauber

Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Dissertation eigenständig von mir und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel angefertigt worden ist.

Die Dissertation wurde in keinem früheren Promotionsverfahren eingereicht. Ich erkläre weiterhin, dass ich mich nicht anderwärtig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. keinen entsprechenden Doktorgrad besitze.

Abschließend erkläre ich, dass mir das zugrundeliegende Promotionsverfahren und die Promotionsordnung vom 27. Juni 2012 bekannt ist.

Datum, Ort

Unterschrift

Der Fortschritt geschieht heute so schnell, dass, während jemand eine Sache für gänzlich undurchführbar erklärt, er von einem anderen unterbrochen wird, der sie schon realisiert hat.

- Albert Einstein

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben. Zunächst möchte ich bei Prof. Dr. Volk und Prof. Dr. Tauber für die Übernahme der Gutachten bedanken. Zusätzlich gilt Prof. Dr. Volk besonderen Dank für die Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Universität. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Ulrich Buller und Dr. Eva Ehrentreich-Förster für die freundliche Aufnahme am Fraunhofer IZI-BB in Potsdam danken. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer bei Fraunhofer und Gutachter Dr. habil. Harald Seitz. Seit meinem Einstieg in seiner Arbeitsgruppe hat er mich gefördert und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Durch ihm war es mir möglich diese Arbeit anzufertigen, aber er ermöglichte mir auch zahllose weitere Möglichkeiten mich zu entwickeln. Nicht zu vergessen sind natürlich alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Seitz: Katja Pratsch, Isabelle Relling, Dr. Robert Wellhausen, Sandra Mükusch und Sabrina Herrmann. Ihnen ist für jede nur vorstellbare Hilfe in fachlichen und organisatorischen Dingen zu danken. Durch sie ist aber auch der Laboralltag um einiges unterhaltsamer gewesen. Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt Dr. Wolf-Rainer Bork und seinen Kollegen vom Landeskriminalamt Berlin. Durch die Zusammenarbeit mit ihnen ist meine Arbeit ein Stück weit interessanter geworden. Leider kann ich nicht alle nennen bei denen ich mich bedanken möchte. Daher hier noch einige ausgewählte: Beate Morgenstern (die gute Seele im Haus), Kathi Grossmann, Michael Franke, Alexander Christmann, Markus Nickisch-Rosenegk, Sebastian Hoppe, Martina Obry, Kai Wunderlich, Katja Uhlig, Erik Rümpel, Dirk Michel, Michaela Schellhase, André Lehmann und alle die ich noch vergessen habe.

Den größten Dank verdienen allerdings viele Leute aus meinem privaten Umfeld: Meine Eltern, ohne deren Unterstützung ich nie soweit gekommen wäre. Meine Großmütter, die mich auch finanziell immer sehr unterstützt haben. Mein Bruder und seine Familie. Hanka Juhnke, die seit mittlerweile 16 Jahren an meiner Seite steht. Peggy Matz, mit ihr war auch schon das Bachelor Studium erträglicher. Und natürlich noch mein Lieblings-Schwabe Bastian C. Müller. Auch wenn er mich manchmal in den Wahnsinn treibt, kann ich mich auf ihn verlassen. Er passt auf mich auf und unterstützt mich wo er kann. Danke, dass du bis heute mich und meine Launen erträgst.

Inhaltsverzeichnis

I. Tabellenverzeichnis	8
II. Abbildungsverzeichnis	9
III. Abkürzungsverzeichnis	12
IV. Zusammenfassung	13
1. Einleitung	14
1.1. Motivation	14
1.1.1. Interesse der Öffentlichkeit	14
1.1.2. Gesundheitsaspekte	16
1.1.3. Anwendungsbereiche	16
1.2. Stand der Forschung	17
1.2.1. Niedermolekulare Substanzen und Drogen	17
1.2.2. Aktuelle Nachweismethoden	17
1.2.2.1. Massenspektrometrie	18
1.2.2.2. Immunoassay	20
1.2.2.3. Aptamere	23
1.3. Richtlinien	24
1.3.1. Anforderungen an die Qualitätssicherung	25
1.3.2. Richtwerte und Charakterisierung der untersuchten Drogen	26
1.4. Antikörper- und Konjugatherstellung	32
1.5. Validierungsprozess	33
1.6. Zielsetzung	33
2. Material und Methoden	35
2.1. Chemikalien und Materialien	35
2.2. Geräte	36
2.3. Puffer	37
2.4. Drogen-BSA Konjugate und reine Drogen	38
2.5. Antikörper	38
2.6. Bereitgestellte Serumproben vom Landeskriminalamt Berlin	40
2.7. Methoden	40
2.7.1. SDS-PAGE	40
2.7.2. Western Blot (semi-dry)	41
2.7.3. ELISA	42

2.7.3.1. ELISA	42
2.7.3.2. Kompetitiver ELISA.....	43
2.7.3.3. Kompetitiver ELISA mit Drogen- oder Antikörpermix	44
2.7.3.4. Bestimmung der Antikörperspezifität im ELISA-Format	45
2.7.3.5. ELISA mit Drogen-positiven Serumproben zur Immobilisierung	45
2.7.4. Herstellung und Prozessierung eines Microarrays	46
2.7.5. Nachweis über Aptamere	48
2.7.6. Statistik.....	48
3. Ergebnisse	50
3.1. Alternative Versuchsansätze zum Drogennachweis	50
3.1.1. Aptamere	51
3.1.2. Alternative ELISA-Strategien: Serum zur Immobilisierung.....	52
3.2. Qualitätskontrolle der Antikörper und Drogen-BSA Konjugate	53
3.2.1. SDS-PAGE und Western Blot.....	53
3.2.2. ELISA.....	57
3.3. Einfluss des Probenmaterials (Serum)	61
3.4. Etablierung des Nachweises freier Drogen über kompetitiven ELISA	63
3.5. Etablierung einer Quantifizierung von Drogen in Serum	68
3.5.1. Einfluss der Vorbereitung des Referenzmaterials.....	69
3.5.2. Überprüfung des Blockierschritts und der Antikörperinkubation	71
3.5.3. Batch-to-Batch Variationen.....	73
3.5.4. Stabilität der Serumproben und beschichteter 96-well MTP	75
3.5.5. Etablierung einer Eichkurve (mit Reproduzierbarkeit)	78
3.5.6. Einfluss von Drogengemischen und Antikörpergemischen auf die Reproduzierbarkeit der Eichgeraden.....	82
3.5.7. Analyse von im Labor hergestellter Blindproben	85
3.6. Analyse von vom LKA bereitgestellten Serumproben und Vergleich mit massenspektrometrischen Daten	88
3.7. Miniaturisierung des Versuchsaufbaus auf Microarrays.....	92
3.7.1. Überprüfung der Funktionalität der Antikörper	92
3.7.2. Optimierung der Versuchsbedingungen	95
3.7.3. Etablierung einer Quantifizierung auf Microarrays	98
3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse	99
4. Diskussion	102

4.1. Nachweis niedermolekulare Substanzen.....	102
4.2. Qualitätskontrolle.....	104
4.3. Quantifizierung	107
4.4. Multiplexing und Miniaturisierung	109
5. Schlussfolgerung.....	111
6. Literaturverzeichnis.....	112
7. Anhang	125
7.1. Alternative Versuchsansätze zum Drogennachweis	125
7.2. Qualitätskontrolle der Antikörper	125
7.2.1. SDS-PAGE und Western Blot.....	125
7.2.2. ELISA.....	129
7.3. Miniaturisierung des Versuchsaufbaus auf Microarrays.....	135
7.3.1. Überprüfung der Funktionalität der Antikörper	135

I. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestimmungsgrenzen für die Drogen in der jeweiligen Substanzklasse	26
Tabelle 2: Chemische Eigenschaften der Drogen	27
Tabelle 3: Übersicht der chemischen Strukturen	31
Tabelle 4: Verwendete Materialien und Chemikalien.....	35
Tabelle 5: verwendete Geräte mit Herstellern.....	36
Tabelle 6: eingesetzte Puffer	37
Tabelle 7: Drogen-BSA Konjugate	38
Tabelle 8: Für die kompetitiven Versuche verwendete Drogen inklusive Hersteller	38
Tabelle 9: verwendete primäre und sekundäre Antikörper	39
Tabelle 10: Bereits einmal vermessene und gelagerte Drogen-positive Serumproben.....	40
Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendeten SDS-PAGE	41
Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Qualitätskontrolle	60
Tabelle 13: Berechnete Konzentrationen der Lagerproben von Methadon	77
Tabelle 14: Übersicht der Ergebnisse für die einzelnen Drogen.....	100
Tabelle 15: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden zum Nachweis illegaler Drogen.	104
Tabelle 16: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden für die Qualitätskontrolle.	105
Tabelle 17: Übersicht der Eigenschaften der Eichkurven.	107

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Kostenstellen verursacht durch illegale Drogen in %.	15
Abbildung 2: Arbeitsschritte einer massenspektrometrischen Messung mit vorgeschalteter chromatographischer Probenauftrennung.	18
Abbildung 3: Vereinfachtes Ergebnis einer GC-MS Messung von MDMA	19
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers	20
Abbildung 5: Aufbau eines kompetitiven ELISAs	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Eichkurve aus einem kompetitiven ELISA	23
Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines semi-dry Western Blots	41
Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines ELISAs	43
Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines kompetitiven ELISAs	44
Abbildung 10: Aufbau eines Objektträgers für einen Microarray	46
Abbildung 11: 16-Kammer-System der Firma Sigma-Aldrich	47
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs	50
Abbildung 13: Ergebnis eines Nachweises von Kokain über ein Aptamer	51
Abbildung 14: Nachweis von MDMA nach Immobilisierung von gespickten Serum	52
Abbildung 15: Eine Coomassie gefärbte SDS-PAGE der primären Antikörper	53
Abbildung 16: Nachweis getesteter primärer Antikörper	54
Abbildung 17: Eine Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Drogen-BSA Konjugate	55
Abbildung 18: Ergebnisse eines Western Blots mit spezifischen Nachweis der Drogen-BSA Konjugate THC-BSA und PCP-BSA	55
Abbildung 19: Ergebnisse eines Western Blots mit dem Antikörper Mo1 gegen Morphin und K2 gegen Kokain	56
Abbildung 20: Überblick der Hintergrundsignale einer schwarzen 96-well MTP	57
Abbildung 21: Ergebnis eines ELISAs mit spezifischen Nachweis der Drogen-BSA Konjugate Benzoylecgonin-BSA und Methadon-BSA	58
Abbildung 22: Ergebnis eines ELISAs mit Nachweis der Drogen-BSA Konjugate Kokain-BSA und Morphin-BSA	59
Abbildung 23: Ergebnis eines ELISAs mit dem Antikörper T2 gegen THC-BSA	62
Abbildung 24: ELISA zum Nachweis von PCP-BSA	63
Abbildung 25: Vergleich kompetitiver ELISAs mit dem Antikörper Me9	64
Abbildung 26: Kompetitiver Nachweis von Kokain und Benzoylecgonin	65
Abbildung 27: Kompetitiver Nachweis von THC	66
Abbildung 28: Kompetitiver Nachweis von Methadon, MDMA und Benzoylecgonin	67

Abbildung 29: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis von Methadon-BSA unter dem Einfluss von steigenden Methanoldmengen	70
Abbildung 30: Ergebniss für die Eichkurve von Methadon-BSA. Die Vorverdünnung des Referenzmaterials wurde in einem bzw. in 2 Gefäßen vorgenommen	71
Abbildung 31: ELISA zum Nachweis von Amphetamin-BSA.....	72
Abbildung 32: Kompetitiver ELISA zum Nachweis von Methadon-BSA mit getrennter und kombinierter Antikörperinkubation.....	73
Abbildung 33: Vergleich eines Nachweises von MDMA-BSA zwischen 2 Batches	74
Abbildung 34: Vergleich eines Nachweises von Methadon-BSA mit Seren der Hersteller Lonza und Invicon.....	75
Abbildung 35: Zusammenfassung der Analyse von gelagerten Methadonproben.....	76
Abbildung 36: Zusammenfassung der Analyse von gelagerten und beschichteten MTPs	78
Abbildung 37: Kompetitiver Nachweis von THC nach verschiedenen Anpassungen.....	79
Abbildung 38: Ergebnisse der Eichkurven für Methadon, MDMA und Benzoylecgonin.....	80
Abbildung 39: a) Nachweis von MDMA unter Zugabe mehrerer Drogen und Drogen-spezifischer Antikörper. b) Nachweis von MDMA unter Zugabe verschiedener primärer Antikörper.....	83
Abbildung 40: a) Nachweis von Benzoylecgonin unter Zugabe mehrerer Drogen. b) Nachweis von Methadon unter Zugabe mehrerer Drogen und Drogen-spezifischer Antikörper	84
Abbildung 41: Ergebnis der Quantifizierung von Blindproben für Benzoylecgonin	86
Abbildung 42: Ergebnis der Quantifizierung von Blindproben für Methadon	87
Abbildung 43: Vergleich der Ergebnisse einer Quantifizierung von Methadon.....	89
Abbildung 44: Vergleich der Ergebnisse einer Quantifizierung von Benzoylecgonin.....	90
Abbildung 45: Vergleich der Ergebnisse einer Quantifizierung von MDMA	91
Abbildung 46: Ergebnis eines Microarrays für Methadon.....	93
Abbildung 47: Ergebnis eines Microarrays für Kokain und Benzoylecgonin	94
Abbildung 48: Ergebnis eines Microarrays für MDMA-BSA	95
Abbildung 49: Ergebnis eines Microarrays für MDMA-BSA. Gegenübergestellt sind Blockierung und Inkubation mit dem primären Antikörper in 2 % BSA und Serum	96
Abbildung 50: Ergebnis eines Microarrays zur Überprüfung der Blockierung mit Serum, Ethanolamin und 2 % BSA	97
Abbildung 51: Kompetitiver Nachweis von MDMA auf einem Microarray.....	98

Abbildung 52: Vergleich einer Eichkurve für MDMA erhalten durch Microarray und kompetitiver ELISA	99
Abbildung 53: Fließschema des Versuchsablaufs der zur Qualitätskontrolle verwendeten Methoden.....	106
Abbildung 54: Fließschema des Versuchsablaufs der zur Quantifizierung verwendeten Methoden.....	108
Abbildung 55: Ergebnis eines Nachweises von Kokain über das Aptamer II	125
Abbildung 56: Western Blot zum Nachweis des Amphetamin-BSA Konjugats	125
Abbildung 57: Western Blot zum Nachweis des Methamphetamin-BSA Konjugats.....	126
Abbildung 58: Western Blot zum Nachweis des Methamphetamin-BSA Konjugats.....	126
Abbildung 59: Western Blot zum Nachweis des MDMA- und Methadon-BSA Konjugats .	127
Abbildung 60: Western Blot zum Nachweis des PCP-BSA Konjugats.....	127
Abbildung 61: Western Blots zum Nachweis des Morphin-BSA Konjugats	128
Abbildung 62: Western Blot zum Nachweis des Kokain-BSA und Benzoylcegonin-BSA Konjugats	128
Abbildung 63: ELISA zum Nachweis des Amphetamin-BSA Konjugats	129
Abbildung 64: ELISA zum Nachweis des Amphetamin-BSA Konjugats	129
Abbildung 65: ELISA zum Nachweis des Methamphetamin-BSA Konjugats.....	130
Abbildung 66: ELISA zum Nachweis des Methamphetamin-BSA Konjugats.....	130
Abbildung 67: ELISA zum Nachweis des Methamphetamin-BSA Konjugats.....	131
Abbildung 68: ELISA zum Nachweis des Methamphetamin-BSA Konjugats.....	131
Abbildung 69: ELISA zum Nachweis des Methamphetamin-BSA Konjugats.....	132
Abbildung 70: ELISA zum Nachweis des MDMA-BSA und PCP-BSA Konjugats.....	132
Abbildung 71: ELISA zum Nachweis des THC-BSA Konjugats	133
Abbildung 72: ELISA zum Nachweis des THC-BSA Konjugats	133
Abbildung 73: ELISA zum Nachweis des Kokain-BSA Konjugats	134
Abbildung 74: ELISA zum Nachweis des Kokain-BSA Konjugats	134
Abbildung 75: Ergebnis eines Microarrays für THC.	135

III. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Extinktionswellenlänge
A. bidest	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
CV	Coefficient of Variation (Variationskoeffizient)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EMCDDA	European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction
GC	Gaschromatographie
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
IgG	Immunglobulin G
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
LKA	Landeskriminalamt
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
MDMA	Methylenedioxymethamphetamin
MS	Massenspektrometrie
MTP	Multititerplatten
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCP	Phencyclidin
Rili-BÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment
SNR	Signal-Rauschen-Verhältnis
StVG	Straßenverkehrsgesetz
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THC	Tetrahydrocannabinol

IV. Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein kompetitiver ELISA etabliert und validiert, der eine Quantifizierung von Drogen im humanen Serum gemäß geltender Richtlinien ermöglicht. Der Nachweis erzielte zudem vergleichbare Ergebnisse zur Referenzmethode (Massenspektrometrie).

Es wurden 9 Drogen (Amphetamin, Methamphetamin, Methylenedioxymethamphetamin (MDMA), Tetrahydrocannabinol (THC), Phencyclidin (PCP), Methadon, Morphin, Kokain und Benzoylecgonin) und insgesamt 33 Antikörper verwendet. Alle Reagenzien durchliefen zunächst ein stringentes Validierungsverfahren. Nach Ausschluss möglicher Kreuzreaktivitäten konnten für 3 Drogen (Methadon, MDMA und Benzoylecgonin) jeweils ein Antikörper bestimmt werden, der eine spezifische und sensitive Quantifizierung der Droge ermöglichte. Mit dem anti-MDMA Antikörper war zusätzlich der Nachweis in einem miniaturisierten Format (Microarray) möglich.

Die verwendeten Antikörper zeigten keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Drogen, Antikörpern, dem Probenmaterial oder anderen Versuchskomponenten. Weiterhin wurde kein Einfluss etwaiger Abbauprodukte im langfristig gelagerten Serum beobachtet.

Durch die Ergebnisse wird gezeigt, dass ein immunologischer Nachweis von Drogenmissbrauch in Serum eine verlässliche Ergänzung zu bestehenden Methoden darstellt. Bei einer Übertragung des immunologischen Ansatzes auf ein Microarray ergibt sich zudem die Möglichkeit mehrere Drogen und Serumproben parallel nachzuweisen bzw. zu vermessen. Der höhere Probendurchsatz, der kompakte Versuchsaufbau und der geringere Verbrauch an Material gehört zu den größten Vorteilen dieser Technik.

1. Einleitung

Die Arbeit beschäftigt sich mit dem immunologischen Nachweis von illegalen Drogen in Serum. Um einen möglichst guten Einstieg in die Thematik zu geben, wird zuerst die Motivation, dabei vor allem warum Drogen als Analyten ausgewählt wurden, erläutert. Anschließend wird der Stand der Forschung bzw. Technik erläutert. Prinzipiell sollen alle Themenbereiche dieser Arbeit angeschnitten werden. Ziel der Einleitung ist es vor allem die Auswahl eines antikörperbasierten Nachweises und die Lücke, welche diese Arbeit füllen soll, darzustellen.

1.1. Motivation

Im Folgenden Abschnitt wird dargestellt, warum ein verlässlicher Nachweis von Drogen relevant ist. Dabei werden die Auswirkungen von Drogenmissbrauch auf Politik und Gesundheit auf nationaler Ebene betrachtet.

Sämtliche nach deutschem Recht illegalen Drogen sind in den Anlagen des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG) [1] aufgeführt. Eine Aufnahme in das Gesetz erfolgt für einen Stoff, sobald wissenschaftlich erwiesen wurde, dass eine Abhängigkeit hervorgerufen werden kann, daraus eine Herstellung eines weiteren Betäubungsmittels möglich ist oder ein Risiko für die Gesundheit besteht.

1.1.1. Interesse der Öffentlichkeit

Die Öffentlichkeit, insbesondere aber Regierung und Gesundheitswesen, hat vor allem ein finanzielles Interesse an der Kontrolle und Eindämmung des Konsums von illegalen Drogen. Zuletzt wurde für das Jahr 2006 eine Aufstellung der Kosten [2], die durch illegale Drogen verursacht werden, erstellt (Abbildung 1).

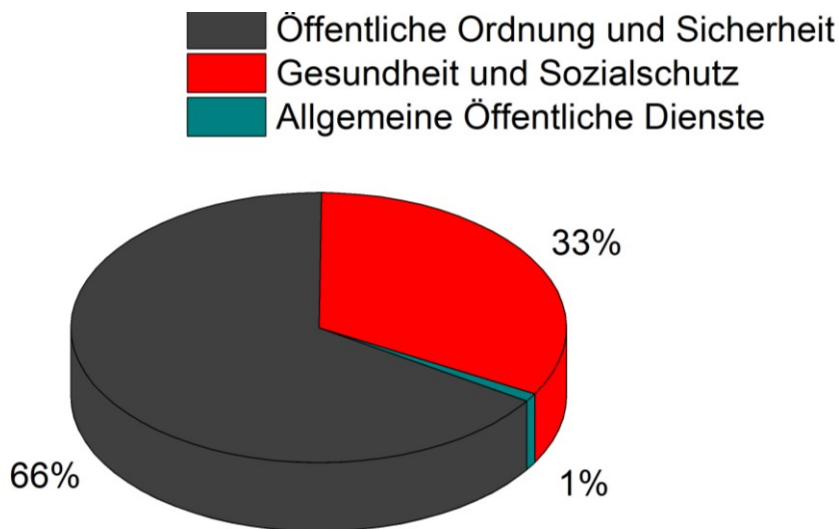


Abbildung 1: Übersicht der Kostenstellen verursacht durch illegale Drogen in %. Die Datenerhebung wurde für das Jahr 2006 durchgeführt. Unter öffentliche Ordnung und Sicherheit fallen sämtliche Kosten der Polizei und Justiz und zu Gesundheit und Sozialschutz zählen die Posten der medizinischen Versorgung und Therapiekosten. Abbildung nach [2].

Die Abbildung 1 zeigt die prozentuale Verteilung der öffentlichen Ausgaben im Jahr 2006. Insgesamt beliefen sich die Kosten, welche im Zusammenhang mit Drogenmissbrauch stehen, auf ca. 6 Mrd. €. Zwei Drittel davon, also etwa 4 Mrd. €, entfallen dabei auf Kosten, die der Polizei und Justiz entstehen. Weitere 2 Mrd. € werden im Gesundheitssektor veranschlagt. Dazu gehören Ausgaben für die medizinische Versorgung, z.B. Notfallmedizin, und für das Gesundheitssystem, z.B. für Therapien. Innerhalb der Notfallmedizin wird der Nutzen des Einsatzes von Drogentests nicht vollständig unterstützt. Vor allem wird dabei diskutiert, ob eine Überprüfung des Drogenkonsums des Patienten Auswirkungen auf die Behandlung hätte [3,4]. Ein Vorteil der Durchführung solcher Tests wird in der Absicherung des behandelnden Arztes gesehen [5], da z.B. Symptome einer Überdosis und einiger Krankheitsbilder, u.a. Vergiftungen, Gemeinsamkeiten aufweisen [6]. Daher wird empfohlen eine individuelle Einschätzung durchzuführen, um gegebenenfalls Ressourcen zu sparen. Angaben zu volkswirtschaftlichen Schäden, u.a. durch Arbeitsausfälle wurden nicht aufgeführt. Als Vergleich lassen sich die Ausgaben der Rentenversicherungen heranziehen. Diese belaufen sich im Zusammenhang mit Drogenmissbrauch für das Jahr 2006 auf ca. 170 Mio. € für etwa 18.000 Fälle und beinhalten die Kosten für z.B. Renten wegen Erwerbsminderungen. Für einen weiteren Vergleich können die Kosten des Tabakkonsums herangezogen werden. Hier belaufen sich die Kosten für Therapie und Erwerbsuntätigkeit auf jährlich 21 Mrd. € [7]. Dies sollte allerdings nur eine Tendenz wiedergeben, da Tabak eine weit verbreitete legale Substanz ist. Nichtsdestotrotz fallen durch längerfristigen Tabakkonsum ähnliche Kosten bei der

Gesundheitsversorgung bzw. für die Marktwirtschaft an, wie beim Konsum illegaler Drogen. Allein durch diese finanzielle Belastung besteht ein großes öffentliches Interesse an der erfolgreichen Verfolgung von Drogenmissbrauch und damit langfristig an einer Reduzierung des illegalen Konsums.

1.1.2. Gesundheitsaspekte

Neben den politischen Faktoren, spielen auch individuelle gesundheitliche Aspekte eine große Rolle [8]. Begleiterscheinungen bei intravenöser Drogeneinnahme sind Infektionen u.a. mit dem HI-Virus oder Hepatitis C-Virus (HCV). In Europa ist der prozentuale Anteil einer HIV-Infektion in Zusammenhang mit Drogenkonsum zwar relativ gering (unter 10 %), führt aber trotzdem zu einer hohen Mortalitätsrate als indirekte Todesursache. Das Auftreten von HCV in diesem Kontext liegt europaweit sogar zwischen 14 % und 84 % und die damit verbundenen Folgeerkrankungen der Leber sind wahrscheinlich für viele weitere Todesfälle verantwortlich. Neben den Infektionserkrankungen zählen Langzeitschäden an Herz und Leber zu den Hauptbegleiterscheinungen von Drogenkonsum. Diese Tatsachen begründen zusätzlich den Bedarf an verlässlichen Drogennachweisen um damit verbundene gesundheitliche Auswirkungen schneller kompensieren zu können.

1.1.3. Anwendungsbereiche

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, sind viele Interessenvertreter für Drogentests im klinischen und rechtlichen Kontext vorhanden. Wichtig bei der Drogenanalytik ist die Entscheidung ob diese lediglich als Indikator für einen Drogenkonsum dienen sollen oder ob eine spezifische und sensitive Ermittlung der konsumierten Droge verlangt wird. Indikatoren dienen meist als sogenannte Schnelltests um z.B. im Straßenverkehr, beim Zoll und in der Notfallambulanz innerhalb kurzer Zeit eine qualitative Aussage zu erhalten, ob Drogen konsumiert wurden. Diese Schnelltests verwenden vor allem Urin oder Speichel als Probenmaterial und können von ungeübten Personen durchgeführt werden. Dabei werden mittels immunologischen Nachweises nur Substanzklassen angezeigt. Durch ein qualitatives Ergebnis der Ermittlung einer Substanzklasse sind diese Nachweis nicht vor Gericht verwertbar. Weiterhin können diese Nachweise durch eine mangelnde Sensitivität und Spezifität gekennzeichnet sein. Weitere Anwendungsgebiete sind die Therapiebegleitung oder Ermittlungen im Zusammenhang einer Straftat. Prinzipiell müssen Drogennachweise, welche spezifisch eine Droge nachweisen und die vorhandene Konzentration angeben, strenge

Richtlinien erfüllen. Diese Richtlinien dienen vor allem der Sicherung der Verlässlichkeit eines Drogennachweises. Die zu erfüllenden Eigenschaften werden von Organisationen wie der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) und der Bundesärztekammer festgelegt. Für einen sensitiven und spezifischen Nachweis werden in Deutschland primär massenspektrometrische Methoden angewendet. Die Funktionsweise verschiedener Nachweismethoden und die Anforderungen relevanter Richtlinien werden detaillierter in den folgenden Abschnitten behandelt.

1.2. Stand der Forschung

Dieser Abschnitt soll einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung geben. Dazu werden Drogen anhand ihrer chemischen Eigenschaften zusammengefasst und aktuelle Nachweismethoden dargestellt.

1.2.1. Niedermolekulare Substanzen und Drogen

Zu den niedermolekularen Substanzen gehören neben den Drogen verschiedene Toxine und sekundäre Metaboliten. Klassifiziert werden diese Substanzen nach der sogenannten „Rule of Five“ [9–11]. Folgende Eigenschaften charakterisieren niedermolekulare Verbindungen: Molekulargewicht um 500 Da, ein logP von maximal 5 (Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient), max. 5 Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren (WBD) und max. 10 Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren (WBA). Einige niedermolekulare Substanzen sind in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und spielen daher auch in der pharmazeutischen Forschung und in der Medikamentenentwicklung eine Rolle [12]. Niedermolekulare Verbindungen können sowohl natürlich vorkommen (z.B. THC und Kokain), als auch künstlich (z.B. MDMA und Methadon) hergestellt werden. Dadurch steigt stetig die Anzahl neuer Substanzen, die dem Betäubungsmittelgesetz unterliegen [13]. Beispielhaft sind synthetische Steroide und Cannabinoide zu nennen [14].

Durch diese große Diversität ergibt sich die Herausforderungen eines verlässlichen Nachweises. Im folgenden Abschnitt sollen einige aktuelle Nachweismethoden erläutert werden.

1.2.2. Aktuelle Nachweismethoden

Aktuell wird in der Drogenanalytik zwischen einem ersten initialen Test, einem sogenannten Screening, und einem Bestätigungstest unterschieden. Das Screening dient einer ersten

Einschätzung der konsumierten Drogenklassen und liefert daher oft nur qualitative Aussagen. Für die Konzentrationsbestimmung und die Kontrolle des Screenings wird ein Bestätigungstest durchgeführt. Dieser unterliegt u.a. bezüglich Sensitivität und Reproduzierbarkeit strengeren Vorgaben als das Screening. Dies ist vor allem durch die spätere Gerichtsverwertbarkeit begründet. Im Folgenden werden drei Methoden, welche in Deutschland in verschiedenen Ausmaßen Anwendung finden, genauer erläutert. Die zu erfüllenden Richtlinien werden in einem gesonderten Kapitel behandelt.

1.2.2.1. Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie (GC) oder Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelt mit Massenspektrometrie (MS) gehört zu den Bestätigungsanalysen, die vor Gericht anerkannt werden. MS-basierte Methoden konnten sich seit ihrer Entwicklung in den 1970er-Jahren [15] durch Sensitivität, Genauigkeit und Quantifizierbarkeit auszeichnen [16].

Chromatographische Methoden, meist werden säulenchromatographische Systeme verwendet, dienen dabei der Auftrennung von Molekülen aus einem Gemisch und die MS wird dann zur abschließenden Detektion und Quantifizierung genutzt. Es ist zu beachten, dass für jeden Analyten die Versuchsbedingungen einzeln definiert werden müssen, insbesondere bei der chromatographischen Auftrennung [17]. Die primär verwendeten Auftrennungsmethoden GC und LC gleichen sich in einer aufwendigen Probenvorbereitung der biologischen Proben [16,18]. Eine GC, in der die Auftrennung einer Probe im gasförmigen Zustand erfolgt, gilt als sensitiver [19], eine Flüssigkeitschromatographie hingegen mit der Probenauftrennung in flüssiger Phase eignet sich für thermal instabile Substanzen [20].

Die Abbildung 2 zeigt ein Schema eines Versuchsablaufs einer MS gekoppelt mit einer chromatographischen Methode. Diese ist allgemein gehalten, um die oben genannten Fakten zusammenzufassen.



Abbildung 2: Arbeitsschritte einer massenspektrometrischen Messung mit vorgeschalteter chromatographischer Probenauftrennung.

Für eine Messung muss der zu untersuchende Analyt zunächst chemisch modifiziert werden, z.B. ist eine Überführung in einen gasförmigen, ionisierten Zustand nötig, bevor sein Molekulargewicht über sein Masse-Ladungs-Verhältnis und ein Referenzmolekül bestimmt

werden kann [21,22]. Gängige chemische Methoden zur Probenvorbereitung sind Derivatisierungen [16], Hydrolysen [18] und Ionisierungen [16,19,23]. Für eine Gaschromatographie werden häufig Dimethylpolysiloxane als Säulenmaterial [20] und Helium, Wasserstoff oder auch Argon als Trägergase verwendet [19,24,25]. Zu bedenken sind die während der Auftrennung teils sehr hohen verwendeten Temperaturen [24,25]. Die Säule einer Flüssigkeitschromatographie besteht aus einer mobilen Phase, einer Flüssigkeit u.a. versetzt mit Lösemitteln, und einer festen stationären Phase, bestehend z.B. aus Sepharose [16,18,23]. Bevor die Probe in den Detektor injiziert werden kann, wird diese z.B. mittels Elektronensprayionisation (ESI) ionisiert [16,19,23]. ESI gilt als ein schonendes Verfahren um Ionisierungen vorzunehmen. Sowohl für eine GC, als auch für eine LC werden abschließend Detektoren, wie eine MS, benötigt. Je nach Fragestellung können nach einem chromatographischen Verfahren andere Detektoren eingesetzt werden, z.B. einen Atomemissionsdetektor für einen elementspezifischen Nachweis [26] oder ein Ionen-Mobilitäts-Spektrometer für flüchtige organische Verbindungen [27,28].

Die Abbildung 3 zeigt ein vereinfachtes Ergebnis einer GC-MS Analyse. Das Ergebnis zeigt eine Analyse eines MDMA-Standards mit einem deutlichen „Peak“ bei einem Masse zu Ladung Verhältnis von knapp über 300.

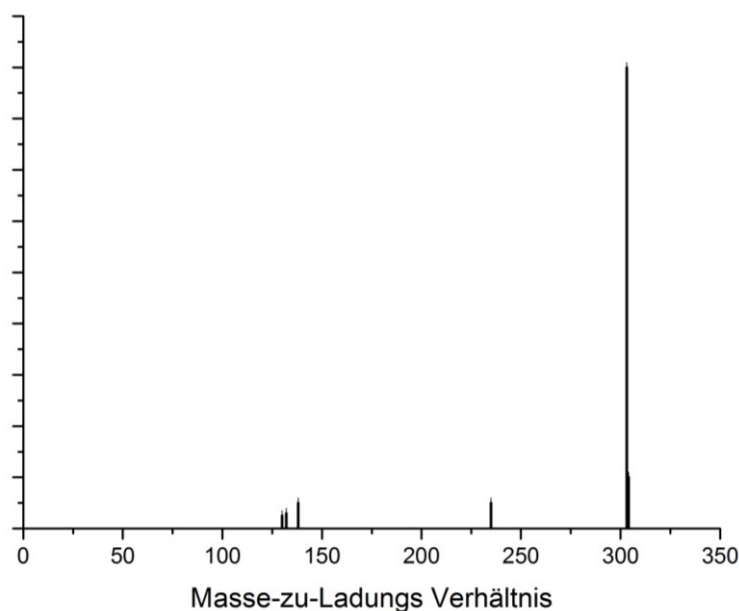


Abbildung 3: Vereinfachtes Ergebnis einer GC-MS Messung von MDMA. Als Probe wurde ein Standard für MDMA verwendet. Der in Methanol gelöste Standard wurde vor der Analyse verdampft und der Rückstand anschließend derivatisiert. Nach [19].

Das Chromatogramm dient der Veranschaulichung der Massenspektrometrie. Neben dem klaren Nachweis einer Droge sollte beachtet werden, dass selbst die Analyse eines reinen

Standards eine mehrere Schritte umfassende Probenvorbereitung benötigt. Die benötigte Modifizierung zählt bei diesen Verfahren zu den Herausforderungen.

Trotz stetigen Weiterentwicklungen sind die benötigten Geräte verhältnismäßig teuer und im Kontext des Drogennachweises ist eine aufwendige Probenvorbereitung nötig, sobald biologische Medien, wie z.B. Blut, untersucht werden sollen [29–31]. Begründet durch die Probenvorbereitung und der Synthese neuer Substanzen besteht ein großer Bedarf an einfachen und günstigen Nachweisverfahren, um den experimentellen Aufwand zu minimieren.

1.2.2.2. Immunoassay

Immunologische Verfahren, allgemein der Nachweis einer Interaktion von einem Antikörper mit seinem Zielanalyten (Antigen), sind durch ihre Robustheit und ein breites Anwendungsspektrum gekennzeichnet. Antikörper lassen sich in mehrere Klassen einteilen. Eine oft verwendete Klasse für molekularbiologische Experimente sind die Antikörper der Klasse Immunglobuline G (IgG). Die Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung eines IgGs.

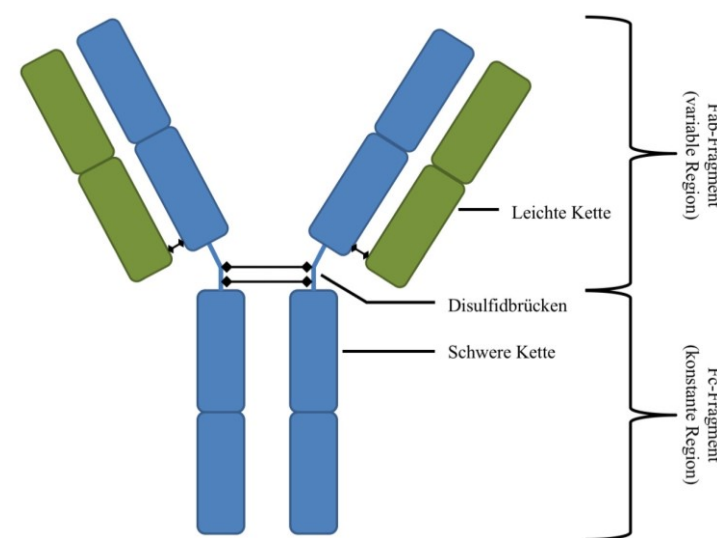


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers. Dieser besteht aus 2 leichten Ketten (grün, je 25 kDa) und 2 schweren Ketten (blau, je 50 kDa). Die Ketten sind über Disulfidbrücken verbunden. Funktional kann eine Unterteilung in ein Antigen-bindendes Fab-Fragment und dem Fc-Fragment vorgenommen werden. Nach [32].

Ein IgG Antikörper besteht aus zwei leichten Ketten (je 25 kDa) und zwei schweren Ketten (je 50 kDa) und hat eine Gesamtmasse von ca. 150 kDa. Das Fab-Fragment bzw. die variable Region, welche die leichten Ketten beinhaltet, dient der Antigenbindung. Daher können für immunologische Nachweise auch nur Fab-Fragmente genutzt werden, die z.B. durch einen

proteolytischen Verdau mit Pepsin [32] des Gesamtmoleküls gewonnen werden. Das Fc-Fragment bildet die konstante Region.

Der erste Immunoassay wurde 1959 von Yalow und Berson [33,34] durchgeführt. Als Markierung wurden zunächst radioaktiv markierte Verbindungen gewählt. Diese zeichnen sich durch eine hervorragende Sensitivität aus, bergen aber ein bekanntes Gesundheitsrisiko. Ein radioimmunologischer Assay (RIA) wurde auch für den ersten etablierten immunologischen Drogennachweis verwendet. Dieser wurde 1970 an der Washington Universität in Zusammenarbeit mit Roche [35] für die Detektion von Morphin durchgeführt. Die ersten enzymatischen Immunoassays (EIA) wurden 1967 publiziert [36]. Diese Erfindung führte im Laufe der Jahre zur Entwicklung von einer großen Bandbreite an kommerziellen Drogentests, welche bis heute zu einem wesentlichen Teil einen enzymatischen Nachweis nutzen.

Die Anwendung von Immunoassays ist in der Drogenanalytik weit verbreitet, da mit dem immunologischen Nachweis eine schnelle und günstige Methode genutzt werden kann [20,37]. Kommerziell erhältliche Tests beschränken sich dabei hauptsächlich auf den quantitativen Nachweis in Urin [38–40]. Ein entscheidender Nachteil von Immunoassays ist das Auftreten von unspezifischen Bindungen der verwendeten Antikörper [41]. Bei der Detektion von verschiedenen Drogen, liegt die vor allem in den strukturellen Gemeinsamkeiten der Moleküle begründet [20,37]. Daher ist eine gewissenhafte Antikörpervalidierung nötig [42], um einen verlässlichen Nachweis zu garantieren. Die Validierung für initiale Tests kann dabei einen geringeren Umfang haben, da hier meist nur nach Substanzklassen unterschieden wird und dabei eine gewisse Kreuzreaktivität der Antikörper genutzt wird. Immunologische Verfahren sind ein häufig verwendetes Mittel um eine erste Selektion bezüglich dem Vorhandensein von Drogen und der Substanzklassen vorzunehmen [20].

Primär genutzte Formate sind dabei „Enzyme-linked Immunosorbent Assays“ (ELISAs) in Multititerplatten (MTP) und „Lateral Flow Assays“ (LFA) auf Teststreifen. Bei beiden Formaten wird dabei ein kompetitiver Ansatz verwendet, welche für niedermolekulare Verbindungen, wie z.B. Drogen, Standard ist [20]. Der allgemeine Aufbau eines kompetitiven ELISAs wird in Abbildung 5 dargestellt.

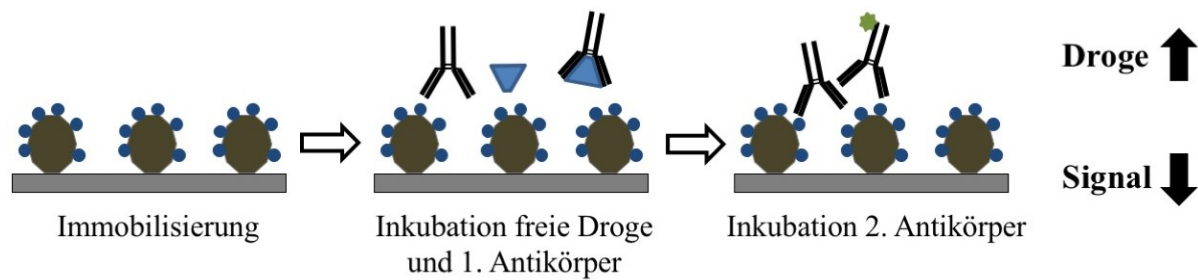


Abbildung 5: Aufbau eines kompetitiven ELISAs. Charakteristisch für diesen Versuchsaufbau sind abnehmende Signale bei zunehmender Konzentration des Analyten.

Zunächst wird ein Konjugat, bestehend aus Drogenmolekülen gekoppelt an ein Trägermolekül, z.B. BSA, auf eine Festphase immobilisiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit der Probe zusammen mit dem Drogen-spezifischen Antikörper. Dabei kommt es zu einer Kompetition zwischen dem Konjugat und der Droge in der Probe um die Bindestellen an dem primären Antikörper. Zur Detektion wird der am Konjugat gebundene primäre Antikörper entweder über einen geeigneten markierten sekundären Antikörper oder über eine direkte Markierung des primären Antikörpers nachgewiesen. Solche Markierungen sind in der Regel ein Enzym, welches abschließend für einen kolorimetrischen Nachweis noch ein Substrat umsetzt, oder ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher direkt ausgelesen werden kann.

Durch die stattfindende Kompetition ist das Verhältnis von Signal zu Drogenkonzentration invers proportional. Dies bedeutet, je mehr Droge in der Probe vorhanden ist, desto schwächer ist das Signal. Dadurch sollte immer eine Versuchskontrolle (Positivkontrolle) mitgeführt werden, die anzeigt ob das Experiment an sich einwandfrei funktioniert hat. Um im kompetitiven Ansatz eine Quantifizierung zu ermöglichen, muss eine Eichkurve mit Referenzmaterial mitgeführt werden (Abbildung 6).

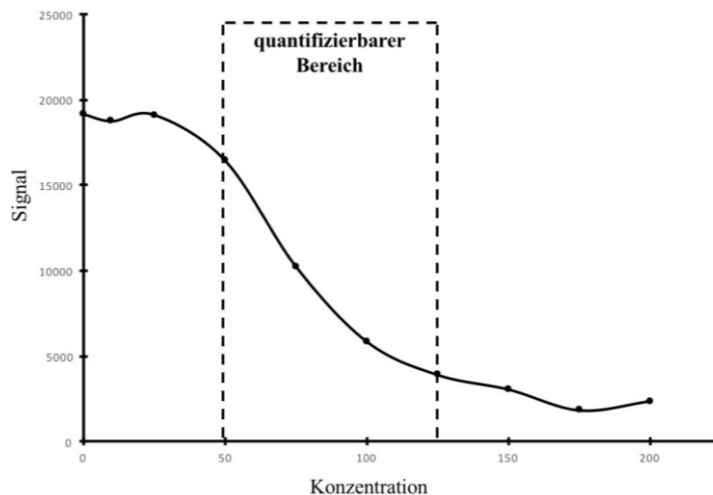


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Eichkurve aus einem kompetitiven ELISA. Dargestellt ist ein exemplarischer Kurvenverlauf. Die gemessenen Signale sind über den eingesetzten Konzentrationen des Referenzmaterials aufgetragen. Hervorgehoben ist der lineare Bereich, der den quantifizierbaren Abschnitt repräsentiert. Anhand der Gleichung des linearen Bereichs und den gemessenen Signalen kann die Konzentration einer unbekannten Probe berechnet werden.

Die Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung einer Eichkurve. Eine Eichkurve für kompetitive ELISAs beginnt und endet mit einem Plateau. Dazwischen befindet sich der lineare Bereich. Dabei ist vor allem der lineare Bereich und dessen Ausdehnung relevant, da nur dieser zur Konzentrationsermittlung genutzt werden kann [43]. Die Qualität der Eichkurve und gut gewählte Konzentrationen des Referenzmaterials bestimmen die Genauigkeit einer Quantifizierung.

1.2.2.3. Aptamere

Die Verwendung von Aptameren gehört zwar nicht zu den Standardverfahren zum Drogennachweis, findet aber gerade im Bereich des Nachweises kleiner Moleküle, z.B. Toxine, immer mehr Anwendung.

Aptamere sind einzelsträngige DNA- oder RNA-Sequenzen [44,45], die in der Lage sind mit ihrem Analyten Tertiärstrukturen auszubilden [46,47]. Die Sequenzen werden im SELEX-Verfahren (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) *in vitro* hergestellt [44–46]. Vereinfacht ausgedrückt wird dabei eine Bibliothek aus randomisierten Nukleinsäuresequenzen mit dem gewünschten Analyten inkubiert. Nach erfolgter Bindung werden nicht gebundene Sequenzen gewaschen. Die gebundenen Sequenzen werden anschließend von ihrem Analyten eluiert und amplifiziert. Diese Schritte werden mehrfach wiederholt um spezifische Binder zu erhalten. Diese Sequenzen werden anschließend amplifiziert und charakterisiert [47]. Die Charakterisierung kann u.a. mit SPR (Surface

Plasmon Resonance), Durchflusszytometrie, Affinitätschromatographie oder mit einer Bead-basierten Methode durchgeführt werden [44,45].

Aptamere können für eine Vielzahl von Molekülen, wie kleine Moleküle, Proteine, Viren, Toxinen oder Zellen, generiert werden [46,45]. Sie besitzen damit den Vorteil einen Binder für nicht-immunogene und toxische Substanzen zu ermöglichen, was sich in der Antikörperherstellung schwierig gestaltet. Die Herstellung von Aptameren ist zusätzlich automatisierbar und die Sequenzen können mit relativ wenig Aufwand modifiziert werden [44,45]. Anwendung finden Aptamere u.a. in der Diagnostik, Proteinaufreinigung oder in der Detektion von posttranslationalen Modifikationen [47].

Zu den Nachteilen beim Nachweis kleiner Molekülen wie Drogen oder Toxine gehören:

- Probleme im SELEX-Verfahren, bedingt durch die Immobilisierung auf einer Festphase [46]. Oft wird dafür eine chemische Modifikation benötigt, die zu einer schlechteren Sensitivität zum Ausgangsmolekül führt.
- Eine SPR eignet sich nur bedingt zur Charakterisierung, da die Zunahme in der Molekülmasse meist zu gering ist um nachweisbar zu sein [46].
- eine verminderte Affinität der Aptamere zum Analyten [44]. Es konnte beobachtet werden, dass je kleiner der Analyt ist, desto größer ist die Dissoziationskonstante (K_d) [46].

Weiterhin wurde beobachtet, dass Aptamere in Blut schneller degradieren [46]. Sofern diese Nachteile reduziert werden können, stellen Aptamere eine vielversprechende Alternative dar. Ihre Herstellung ist im Vergleich zu Antikörpern um einiges schneller und preiswerter, da alle Schritte *in vitro* erfolgen.

1.3. Richtlinien

Im Kontext von einem Drogennachweis müssen bestimmte Eigenschaften nachgewiesen werden. Dies betrifft vor allem die Sensitivität, die Reproduzierbarkeit und die Genauigkeit. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich zur Qualitätssicherung an verschiedenen Richtlinien orientiert. Damit soll vor allem die Qualität und Vergleichbarkeit einer Analyse garantiert werden. Im folgenden Abschnitt soll die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung (Rili-BÄK) [48] und die Anforderungen der deutschen Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) [49] erläutert werden. Diese sind für eine toxikologische Diagnostik maßgebend.

1.3.1. Anforderungen an die Qualitätssicherung

Rili-BÄK beschreibt die Anforderungen für Labor-medizinische Untersuchungen in der Heilkunde. Diese misst unter anderem der lückenlosen Dokumentation eine große Bedeutung bei. Weiterhin ist die Teilnahme an Ringversuchen verpflichtend. Durchgeführte Messungen sollten sowohl bei Ringversuchen, als auch bei der internen Qualitätssicherung, eine Messabweichung von 20 % nicht überschreiten. In der internen Qualitätssicherung wird außerdem eine tägliche Kontrollmessung verschiedener Substanzen, wie z.B. Drogen, durchgeführt. Für immunologische Verfahren gilt, dass für Antikörper und Antigene jeweils Positiv- und Negativkontrollen vorhanden sein müssen. Bei diesen Kontrollen werden keine Abweichungen toleriert. Antikörper werden bei Chargenwechsel, Antigene hingegen täglich überprüft. Bei kommerziell erhältlichen Schnelltests wird eine Testmessung pro Verpackungseinheit durchgeführt.

Die GTFCh hat sehr genaue Vorgaben für den forensisch-toxikologischen Bereich erarbeitet. Allen voran steht der selektive und spezifische Nachweis eines Analyten oder einer Substanzklasse. Dies bedeutet, dass die gewählte Methode eine eindeutige Identifizierung ermöglicht, welche unabhängig von dem Einfluss anderer Substanzen, wie z.B. Metaboliten, Abbauprodukte oder Mediumeinflüsse, ist. Im Folgenden werden die wichtigsten einzuhaltenden Parameter für chromatographische Methoden genannt und kurz erläutert. Bei der Verwendung immunchemischer Verfahren, wird auf die Qualitätskontrolle des Herstellers, u.a. bezüglich Reproduzierbarkeit und Sensitivität, verwiesen:

- Systematischer Fehler (Bias): Abweichung des Messergebnisses vom Sollwert; 15 % - 20 % akzeptabel
- Reproduzierbarkeit: Genauigkeit unabhängiger Messungen; 15 % - 20 % sind als akzeptabel definiert.

Zusätzlich sind die Einfrier- und Auftaustabilität und die Langzeitstabilität der Analyten im Probenmaterial ein wichtiger Faktor, den es in der Qualitätssicherung zu beachten gilt. Bezüglich der analytischen Grenzen nennt die GTFCh ein Signal-Rauschen-Verhältnis (SNR) von 3:1 als eine Möglichkeit die Nachweisgrenze (LOD) zu ermitteln. Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze (LOQ) gilt die niedrigste Konzentration des Analyten, die mit einer akzeptablen Genauigkeit und Bias bestimmt werden kann. Für immunchemische Methoden wird auf genauere Angaben verzichtet, da die Überprüfung bereits vom Hersteller durchgeführt werden sollte. Zur Kontrolle wird allerdings empfohlen 10 Leerproben (Probenmaterial ohne Analyten) und 10 authentische Proben zu vermessen. Bei den Leerproben müssen 100 % als

negativ klassifiziert werden, während für die authentischen Proben für 90 % der Fälle ein positives Ergebnis akzeptabel ist. Zu erreichende Bestimmungsgrenzen und eine Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten Drogen werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

1.3.2. Richtwerte und Charakterisierung der untersuchten Drogen

Die GTFCh hat für forensisch relevante Analyten zu erreichende Bestimmungsgrenzen in den verschiedenen biologischen Probenmaterialien festgelegt [50]. Diese beziehen sich auf bestätigende chromatographische Methoden. Zusätzlich werden für bestimmte Substanzklassen Empfehlungen gegeben, wie z.B. die Mitbestimmung von Metaboliten wie THC-Carbonsäure von THC (Tetrahydrocannabinol). Ähnliche Hinweise werden für Amphetamine und Kokain gegeben. In der folgenden Tabelle 1 werden die zu erreichenden Bestimmungsgrenzen für die in dieser Arbeit verwendeten Drogen aufgeführt.

Tabelle 1: Darstellung der Bestimmungsgrenzen für die einzelnen Drogen in ihrer jeweiligen Substanzklasse. Die Grenzen gelten für die Verwendung von Serum bzw. Plasma und werden in ng/mL angegeben.

Substanzklasse und Droge	Bestimmungsgrenze in Serum/Plasma [ng/mL]
Cannabinoide	
THC (Delta-9-Tetrahydrocannabinol)	1
Amphetamin und Derivate	
Amphetamin	25
Methamphetamin	
MDMA (Methylenedioxymethamphetamin)	
Kokain und Metaboliten	
Kokain	10
Benzoylecgonin	30
Opiate/Opioide	
Morphin	10
Methadon	50
Dissoziativum	
PCP (Phencyclidin)	25 [51]

Die aufgelisteten Drogen unterliegen alle dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG) und sind zum Teil zusätzlich noch im Straßenverkehrsgesetz (StVG) § 24a Anlage 2 aufgeführt [52]. Die Nennung im StVG, die Relevanz im deutschsprachigen Raum hinsichtlich der Häufigkeit des Konsums und die Verfügbarkeit von Drogen-BSA Konjugaten und primären Antikörpern diente als Grundlage für die Auswahl.

Als nächstes werden die einzelnen Drogen gemäß ihren chemischen Eigenschaften charakterisiert (Tabelle 2a-c). Dabei werden einige wichtige Daten zusammengefasst.

Tabelle 2a: Chemische Eigenschaften der Drogen Amphetamin, Methamphetamin und MDMA. Neben den Charakteristika der „Rule of Five“ werden die Wirkmechanismen im Menschen kurz genannt.

	Amphetamin	Methamphetamin	MDMA
PubChem ID	3007	1206	1615
Formel	C ₉ H ₁₃ N	C ₁₀ H ₁₅ N	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂
Molekulargewicht [g/mol]	135,21	149,23	193.24
Vorkommen	synthetisch		
WBD	1		
WBA	1		3
logP	1,76	2,07	2,28
Pharmakologie	Stimuliert das Zentrale Nervensystem (ZNS)		Bewirkt v.a. Freisetzung von Serotonin und Dopamin
Referenzen	[53,54]	[53,55]	[56,57]

Tabelle 2b: Chemische Eigenschaften der Drogen THC, Kokain und Benzoylecgonin. Neben den Charakteristika der „Rule of Five“ werden die Wirkmechanismen im Menschen kurz genannt.

	THC	Kokain	Benzoylecgonin
PubChem ID	16078	446220	448223
Formel	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄
Molekulargewicht [g/mol]	314,46	303,35	289,33
Vorkommen	Natürlich		Hautabbauprodukt von Kokain
WBD	1	0	1
WBA	2	5	
logP	5,65	2,3	-
Pharmakologie	Bindet an CB Rezeptoren im ZNS und wirkt schmerzlindernd	Erhöht Transmitterkonzentrationen in dopamin- und noradrenalin sensiblen Rezeptoren	Gebildet durch Hydrolyse von Kokain in der Leber durch Carboxylesterase
Referenzen	[58,59]	[60–62]	[63–65]

Tabelle 2c: Chemische Eigenschaften der Drogen Methadon, Morphin und PCP. Neben den Charakteristika der „Rule of Five“ werden die Wirkmechanismen im Menschen kurz genannt.

	Methadon	Morphin	PCP
PubChem ID	4095	5288826	6468
Formel	C ₂₁ H ₂₇ NO	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	C ₁₇ H ₂₅ N
Molekulargewicht [g/mol]	309,45	285,34	243,39
Vorkommen	Synthetisch	Natürlich	Synthetisch
WBD	0	2	0
WBA	2	4	1
logP	3,93	0,89	3,63
Pharmakologie	Wirkt im ZNS und hat schmerzlindernde Effekte		Wirkt als Antagonist des NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptors und hat halluzinogene Effekte
Referenzen	[66–68]	[69,70]	[71,72]

Die Tabelle 2a-c sollen einen kurzen Überblick über die untersuchten Drogen ermöglichen. Die Tabellen zeigen, dass die Kriterien der genannten „Rule of Five“ erfüllt werden und, dass einige Eigenschaften, wie vorhandene WBD oder WBA, insbesondere innerhalb einer Substanzklasse sehr ähnlich sind.

Generell wirken die genannten Drogen auf die Freisetzung von Neurotransmittern und einigen Signalwegen, z.B. über G-gekoppelte Proteine wie den cAMP-Signalweg [73]. Für einige Substanzen konnten spezielle Rezeptoren identifiziert werden, z.B. die CB-Rezeptoren (Cannabinoid) für THC [74,75]. Der Metabolismus konsumierter Drogen findet vor allem in der Leber über die Cytochrom P450 Enzyme statt [74,67]. Folgende pharmakologische Eigenschaften sind für die jeweiligen Substanzen bzw. Substanzklassen beschrieben [76,77]:

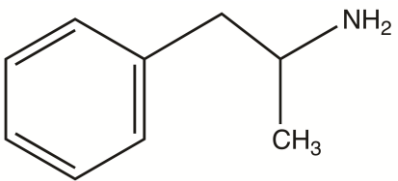
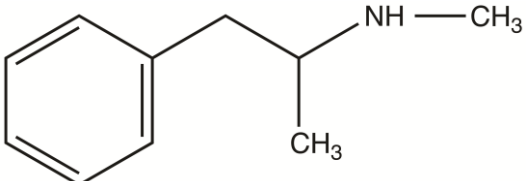
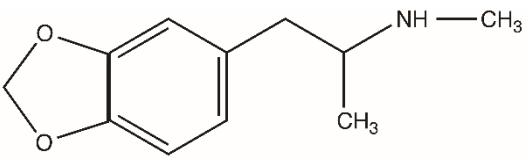
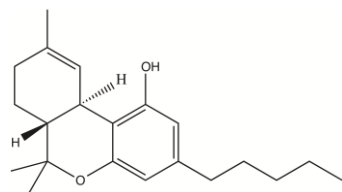
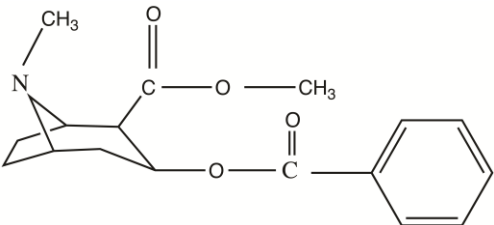
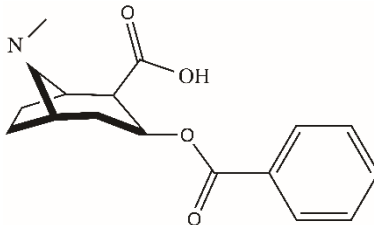
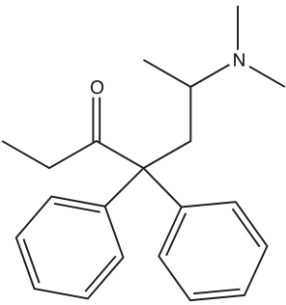
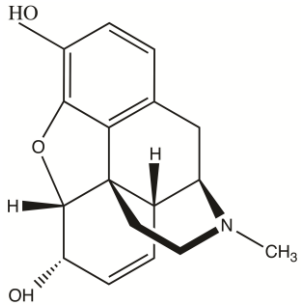
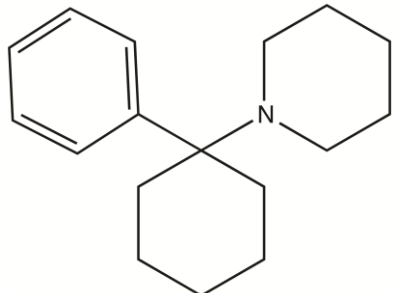
- Amphetamine: Diese Gruppe gehört zu den Stimulantien und fördert damit die geistige und motorische Aktivität. Amphetamine fördern aktiv die Freisetzung von Dopamin, Norepinephrin, Epinephrin und Serotonin. Dadurch wird das sympathische Nervensystem stimuliert. Bei zu hoher Dosierung können u.a. visuelle Halluzinationen auftreten. Die Halbwertszeit beträgt 6 – 12 Stunden. Kernstationen des Metabolismus der Amphetamine ist eine aromatische Hydroxylierung und eine oxidative Deaminierung zu Benzoessäure.
- Kokain: Kokain ist ein stimulierend wirkendes Alkaloid, welches zuerst 1855 aus der Pflanze *Erythroxylon coca* isoliert wurde. Seine Wirkung erhält Kokain durch die Blockierung der Wiederaufnahme von Dopamin, Serotonin und Norepinephrin. Die Halbwertszeit beträgt 30 – 90 Minuten. Das Hauptabbauprodukt Benzoyllecgonin entsteht durch Hydrolyse.
- THC: Tetrahydrocannabinol ist der psychoaktive Bestandteil der Pflanze *Cannabis sativa*. Die schnelle, schmerzlindernde Wirkung erreicht bereits nach etwa 15 – 30 Minuten das Maximum und kann bis zu 3 Stunden anhalten. Der Abbau von THC führt über das aktive Hydroxy-THC und folgend über die inaktive THC-Carbonsäure.
- Opiate: Das Opiat Morphin ist ein Alkaloid, welches als Grundbaustein anderer semi-synthetischer Opioide wie Heroin dient. Seine schmerzlindernde Wirkung erreicht es durch die Nachahmung endogener Neurotransmitter.
- Methadon: Methadon ist ein synthetisches Opioid welches in der Schmerz- bzw. Drogenersatztherapie verwendet wird. Die Halbwertszeit beträgt 15 – 55 Stunden, wobei ein schmerzlindernder Effekt nur 4 – 6 Stunden andauert.
- PCP: Phencyclidin ist ein Halluzinogen, welches in den 1950er Jahren als Analgetikum entwickelt wurde. Durch die halluzinogene Wirkung wird es im chirurgischen Bereich

nicht mehr eingesetzt. Je nach Dosierung kann der Konsum von PCP vielfältige Auswirkungen haben. Dazu gehören schmerzlindernde Effekte und Verhaltensänderungen wie Euphorie oder Paranoia.

Für alle genannten Substanzen gilt, dass ein langfristiger Konsum neben der Abhängigkeit zu einer Toleranz führt. Die oft damit verbundene Dosiserhöhung kann wiederum zu gesundheitlichen Schäden führen.

Die chemischen Strukturen als ein weiteres Charakteristika werden in der folgenden Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Übersicht der chemischen Strukturen der verwendeten Drogen. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des Programms ChemDraw erstellt. Die 2D-Darstellung und die 3D-Konformation sind unter der jeweiligen PubChem ID (Tabelle 2a-c) zu finden.

<p>Amphetamin</p> 	<p>Methamphetamin</p> 
<p>MDMA</p> 	<p>THC</p> 
<p>Kokain</p> 	<p>Benzoylcegonin</p> 
<p>Methadon</p> 	<p>Morphin</p> 
<p>PCP</p> 	

Wie bereits zuvor erwähnt, sind bei den verwendeten Substanzen einige strukturelle Gemeinsamkeiten gegeben. Ein gemeinsames Merkmal der hier gezeigten Substanzen ist das Vorkommen mindestens eines aromatischen Rings. Die Schwierigkeit einer Unterscheidung

innerhalb einer Substanzklasse wird vor allem an den Beispielen Amphetamin und Methamphetamin oder Kokain und Benzoylcegonin deutlich. Dazu muss z.B. das Fehlen einer Methylengruppe (CH_2) erkannt werden. Dies kann immunologisch nur mit hoch spezifischen Antikörpern erreicht werden. Die Herstellung und Validierung solcher Antikörper soll in den folgenden Abschnitten kurz erläutert werden.

1.4. Antikörper- und Konjugatherstellung

Niedermolekulare Verbindungen rufen in der Regel keine Immunantwort *in vivo* hervor. Daher werden für eine Immunisierung diese Verbindungen an größere Trägermoleküle gekoppelt [43]. Häufig verwendete Trägermoleküle sind BSA (Bovines Serumalbumin) oder KLH (Schlitzschnecken-Hämocyanin). Um die Selektivität der späteren Antikörperproduktion zu verbessern, werden Linker, wie z.B. Anhydride oder Amine, zwischen Träger und den Molekülen eingesetzt. Die Kopplung von Molekülen an das Trägerprotein kann anschließend über EDC-NHS-Chemie erfolgen. Weiterhin sollten in der Konjugatherstellung folgende Punkte beachtet werden: Anzahl gekoppelter Moleküle und Position des Trägermoleküls. Das Trägermolekül sollte räumlich eine gewisse Entfernung zur chemischen Gruppe aufweisen, welche charakteristisch für die niedermolekulare Verbindung ist. Dadurch kann gewährleistet werden, dass ein Antikörper produziert wird, der spezifisch diese funktionelle Gruppe erkennt und keine Kreuzreaktivitäten zum Trägermolekül aufweist [78–80].

Diese Konjugate werden dann zur Immunisierung genutzt. Im Folgenden wird die Antikörperherstellung bei der Verwendung von Konjugaten beschrieben. Hierbei handelt es sich um die Herstellung monoklonaler Antikörper. Oft genutzte Tiere hierfür sind Mäuse. Nach einer initialen Immunisierung mit einer Lösung bestehend aus dem Konjugat und einem Adjuvanz werden nach 2 -3 Monaten zwei weitere Injektionen in einem Abstand von jeweils 6 Wochen vorgenommen. Das Adjuvanz dient der Stimulierung der Immunantwort [81]. Die zusätzlichen Injektionen sollen die Produktion der durch die initiale Immunisierung entwickelten Antikörper fördern. Nach 5 – 6 Monaten nach der initialen Immunisierung wird das Blut und/oder die Milz des Versuchstieres entnommen. Aus diesem Material können abschließend die Antikörper gewonnen werden. Dazu wird das Material homogenisiert und nach mehrmaligen Waschen mit Myelomzellen zusammengeführt. Die Antikörper werden in den B-Lymphozyten produziert, welche in der Milz gebildet werden. Für eine bessere Überlebensrate der Zellen wird die Fusionierung der B-Lymphozyten mit Myelomzellen durchgeführt. Eine einfache und schnelle Methode zur Fusionierung ist die Elektrofusion. Die fusionierten Zellen werden in einem konditionierten Medium mit Selektionsmarker ausplattiert.

Nach abgeschlossener Selektion und Überführung in ein Normalmedium können die vorhandenen Klone über das gewünschte Antigen (Konjugat) selektiert [22,82,83] werden. Für eine detailliertere Beschreibung der Herstellung verschiedenster Antikörper sind weitere Publikationen heranzuziehen [22, 43].

Die Konjugate, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind kommerziell erhältlich. Über die verwendete Kopplungsreaktion waren keine Angaben vom Hersteller erhältlich.

1.5. Validierungsprozess

Die Fähigkeit von Antikörpern eine hoch affine Bindung zu ihrem Analyten einzugehen, ist unbestritten. Ein großer Nachteil besteht jedoch darin, dass oft Kreuzreaktivitäten (strukturell ähnliche Konjugate) und unspezifische Bindungen (andere Testbestandteile wie Serum etc.) auftreten [84,85]. Dies bedeutet, dass jede Komponente in einem Experiment überprüft werden muss. Hinzukommt, dass zu kommerziell erhältlichen Antikörpern meist nur geringe Informationen bezüglich der Spezifität vorliegen.

Folgende Aspekte sollten innerhalb einer Antikörpervalidierung überprüft werden [30,86]:

- Ausschluss von unspezifischen Bindungen mittels Negativkontrollen: verwendete Puffer zum Ansetzen von Verdünnungen und Waschschritten, Trägermolekül (z.B. BSA) und die biologische Matrix (z.B. Serum).
- Sofern ein sekundärer Antikörper zur Detektion verwendet wird: Sicherstellen der Interaktion von Analyt-spezifischem Antikörper und Detektionsantikörper
- Überprüfung der Spezifität über weitere Konjugate/Analyten, welche im selben Kontext stehen, aber strukturell verschieden sein sollten.

Erst sobald Kreuzreaktivitäten ausgeschlossen und die Spezifität sichergestellt wurde, kann ein Antikörper als validiert betrachtet und somit in weiteren Untersuchungen eingesetzt werden [87–89].

1.6. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, einen spezifischen Drogennachweis auf immunologischer Basis mit der Möglichkeit eines parallelen Nachweises mehrerer Substanzen zu etablieren. Zur Überprüfung wurden Drogen-positive Serumproben quantitativ mittels einem ELISA vermessen und mit der Referenzmethode GC-/LC-MS verglichen. Für die Etablierung eines parallelen Nachweises wurde ein Microarray aufgebaut.

Für die Etablierung des Nachweises wurden zunächst für die 9 Drogen Amphetamin, Methamphetamin, Methylenedioxymethamphetamin (MDMA), Tetrahydrocannabinol (THC), Phencyclidin (PCP), Methadon, Morphin, Kokain und Benzoyllecgonin eine Antikörpervalidierung durchgeführt. Hauptaugenmerk lag auf einem spezifischen Nachweis des jeweiligen Drogen-BSA Konjugats ohne Kreuzreaktivitäten mit anderen Konjugaten bzw. Versuchskomponenten. Anschließend wurde eine Optimierung der Versuchsbedingungen und die Etablierung der Eichgeraden vorgenommen. Zur finalen Überprüfung des Nachweises wurden authentische Serumproben, welche vom Landeskriminalamt Berlin bereitgestellt wurden, vermessen und mit vorhandenen Ergebnissen aus Massenspektrometrie-Messungen verglichen. Für den parallelen Nachweis mehrerer Drogen mittels Microarray wurden die Konjugate auf funktionalisierte Objektträger immobilisiert. Damit sollte vor allem der Probendurchsatz erhöht und der Verbrauch an Antikörpern reduziert werden.

Ziel war es unter Einhaltung aktueller Richtlinien einen sensitiven und spezifischen Nachweis zu etablieren, der vergleichbar zu bestehenden Massenspektrometrie Methoden ist. Eine aufwendige Probenvorbereitung und die Verwendung teurer und spezialisierter Geräte sollte dadurch vermieden werden.

2. Material und Methoden

In den folgenden Tabellen werden die verwendeten Chemikalien, Drogen-BSA Konjugate, reine Drogen, Geräte und verwendete Antikörper aufgelistet (Tabelle 4 bis Tabelle 9).

2.1. Chemikalien und Materialien

Tabelle 4: Verwendete Materialien und Chemikalien. Zu allgemeinen Chemikalien zählen u.a. Natriumchlorid und Glycin etc.. Diese wurden von der Firma Merck bezogen.

Materialien	Hersteller
30 %-Polyacrylamid	Roth
384-well-Mikrotiterplatten	Genetix
96-well-Multititerplatten (schwarz, Maxisorp)	Nunc
Agarose, LE, Analytical Grade	Promega
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad
Blotting-Grade Blocker nonfat dry milk	Biorad
Bovines Serum Albumin – aufgereinigt (10 mg/mL)	New England Biolabs
Bovines Serum Albumin Fraktion V	Roth
Chromatographiebögen (3 mm)	Whatman Int. LTD.
Coomassie Blue G250	Roth
Epoxy-modifizierte Objektträger	Eigenproduktion Fraunhofer IZI-BB
Ethanolamin	Carl Roth
Grace Bio-Labs ProPlate® microarray system; 16 Kammer-System	Sigma-Aldrich
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PonceauS-Lösung	AppliChem
PVDF-Membran	Merck Millipore
Standardserum I	Lonza Walkersville Inc.
Standardserum II	UTAK Laboratories
Standardserum III	SeraCare Life Sciences
TEMED	Invitrogen
Tween-20	Roth

2.2. Geräte

Tabelle 5: verwendete Geräte mit Herstellern

Geräte	Hersteller
Elektrophorese Gelkammern	Hoefer
Typhoon R3 Fluoreszenzscanner	Amersham Bioscience
Heizblock	Eppendorf
GenePix 4300A Microarray Scanner	Molecular Devices
iTwo 400 Spotter mit Piezo Nozzle	M2-Automation
Bio-Plex Pro™ Wash Station	Biorad
FLUOstar Omega Plattenreader	BMG Labtech GmbH
Rollenmischer	Neolab
Vakuumverpackungsmaschine	Boss
Multititerplattenschüttler	Heidolph
Western Blot-Apparatur	Eigenbau MPI für molekulare Genetik - Berlin

2.3. Puffer

Tabelle 6: eingesetzte Puffer [90]

10xPBS pH 7,2-7,4	1,37 M NaCl 26,8 mM KCl 78,1 mM Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O) 14,7 mM KH ₂ PO ₄
10xTBE	89 mM Tris pH 8,3 89 mM Borsäure 20 mM Na ₂ EDTA pH 8
5xCCE-Puffer	1 M Tris pH 6,8 5,7 % SDS 14 % v/v Glycerol (87 %) 7 % v/v β-Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau
Blotting-Puffer	4 mM Glycin 4,8 mM Tris pH 8,5 0,4 % v/v SDS 20 % v/v analytischer Methanol
Coomassie-Färbelösung	45 % v/v analytischer Methanol 10 % v/v Eisessig 0,25 % w/v Coomassie Blue G250
5xSDS-Laufpuffer	623,25 mM Tris pH 8,3 6,26 M Glycin 0,5 % w/v SDS
Karbonatpuffer pH 9,56	28,6 mM Na ₂ CO ₃ 72,13 mM NaHCO ₃
Blockierungslösungen pH 9,0	2 % v/v BSA 0,05 % v/v Tween-20 add 1xPBS
	50 mM Ethanolamin 0,1 % v/v SDS add 0.1 M Tris

2.4. Drogen-BSA Konjugate und reine Drogen

Tabelle 7: Drogen-BSA Konjugate der Firma Fitzgerald Industries inklusive Bestellnummer und Rate der konjugierten Droge pro BSA-Molekül

Konjugat	Bestellnummer	Ratio Metabolit : BSA
Amphetamin-BSA	80-IA22	25:1
Methamphetamin-BSA	80-IM59	10:1
MDMA-BSA	80-1044	10:1
Methadon-BSA	80-IM55	10:1
PCP-BSA	80-IP10	10:1
THC-BSA	80-IT63	10:1
Morphin-BSA	80-IM50	38:1
Kokain-BSA	80-1034	10:1
Benzoylecgonin-BSA	80-IB31	25:1

Tabelle 8: Für die kompetitiven Versuche verwendete Drogen inklusive Hersteller. Alle Lösungen wurden in reinem Methanol und in einer Konzentration von 100 µg/mL geliefert.

Droge	Hersteller	Bestellnummer
Amphetamin	Cerilliant Corporation	A-011
Methamphetamin	Cerilliant Corporation	M-022
	LGC GmbH	LGCAMP0964.01-02
MDMA	Cerilliant Corporation	M-011
Methadon	Cerilliant Corporation	M-019
	LGC GmbH	LGCAMP0531.08-02
PCP	LGC GmbH	LGCAMP1358.80-02
THC	LGC GmbH	LGCAMP1088.00-02
Morphin	LGC GmbH	LGCAMP0037.09-02
Kokain	LGC GmbH	LGCAMP1345.05-12
Benzoylecgonin	LGC GmbH	LGCAMP1345.04-02

2.5. Antikörper

Bei der Auswahl der monoklonalen Antikörper (Tabelle 9) wurde wie folgt vorgegangen: Auswahl des Wirtsorganismus Maus, Verwendung des Immunogens Droge-BSA, Angaben über keine vorhandenen Kreuzreaktivitäten und geeignet für die Anwendung im ELISA. Da

nur ein sekundärer Antikörper verwendet werden sollte, war der Einsatz eines einzelnen Wirtsorganismus nötig.

Tabelle 9: verwendete primäre (monoklonale) und sekundäre (polyklonale) Antikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	ID
Anti-Amphetamin	Fitzgerald Industries	10-A44E	A1
	Acris Antibodies GmbH	AM31389PU-N	A2
	Hybrotec GmbH	Auftragsproduktion	A3 – A4
Anti-Methamphetamin	Fitzgerald Industries	10-M25E	Me1
	Abcam plc	ab47866	Me2
	Selective Antibodies Limited	METH267220238	Me3
	Hybrotec GmbH	Auftragsproduktion	Me4 – Me12
Anti-MDMA	Acris Antibodies GmbH	AM31585PU-N	MD1
Anti-Methadon	Fitzgerald Industries	10-M01B	Mt1
Anti-PCP	Acris Antibodies GmbH	BM680	P1
	Abcam plc	ab20457	P2
Anti-THC	Acris Antibodies GmbH	BM2701	T1
	Hybrotec GmbH	Auftragsproduktion	T2 – T3
Anti-Morphin	Fitzgerald Industries	10-M18G	Mo1
	Abnova	MAB1544	Mo2
	Abcam plc	ab23357	Mo3
Anti-Kokain	Fitzgerald Industries	10-1030	K1
	Bioss	BSM-2117M	K2
	Hybrotec GmbH	Auftragsproduktion	K3 – K6
Anti-Benzoylecgonin	Acris Antibodies GmbH	BM2584	B1
Anti-Maus IgG Alexa Fluor® 555	Thermo Fisher Scientific	A-21422	
Anti-Maus IgG Alexa Fluor® 594	Thermo Fisher Scientific	A-11020	

2.6. Bereitgestellte Serumproben vom Landeskriminalamt Berlin

Die Serumproben (Tabelle 10) dienten der Verifizierung der etablierten Methodik. Diese wurden mindestens 3 Jahre gelagert und der Gehalt an Drogen mittels einer massenspektrometrischen Anwendung quantifiziert. In der folgenden Übersicht soll zunächst ein grober Überblick über vorhandene Proben gegeben werden.

Tabelle 10: Bereits einmal vermessene und gelagerte Drogen-positive Serumproben. Es wurde meist neben der gemessenen Droge das Messjahr, die Messmethode und ein Konzentrationsbereich angegeben. (k.A. = keine Angaben)

Droge	Messjahr	Messmethode	Konzentrationsbereich [ng/mL]	Probenanzahl
MDMA	2012	GC-MS	0 – 250	12
Methadon	k.A.	LC MS-TOF	Nur qualitativ	12
THC	2012	k.A.	0 – 27	20
Morphin	2012	GC-MS	0 – 40	14
Kokain	2012	GC-MS	0 – 330	9
Benzoyllecgonin	2012	GC-MS	0 – 510	11

2.7. Methoden

2.7.1. SDS-PAGE

Bei einer SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden Proteine in denaturierter Form auf ein Polyacrylamidgel (Tabelle 11) aufgetragen und in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt.

Die Denaturierung der Proben erfolgte durch Zugabe von 5xCCE-Puffer und anschließendem Aufkochen für 5 Minuten bei 95 °C. Die Polyacrylamidgele wurden in Hoefer-Kammern eingespannt und SDS-Laufpuffer wurde sowohl in die obere, als auch in die untere Pufferkammer gegeben. Die Elektrophorese wurde beendet sobald die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hat. Für die Detektion der Proteinbanden wurde das Gel für 5 Minuten mit Coomassie-Lösung gefärbt und mit Wasser entfärbt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendeten SDS-PAGE (Volumen für 6 Gele)

SDS-PAGE (8 % Polyacrylamid)

Trenngel	Sammelgel
18,5 mL A. bidest	13,6 mL A. bidest
10,7mL 30 %-Polyacrylamid	3,4 mL 30 %-Polyacrylamid
10 mL 1,5 M Tris pH 8,8	2,5 mL 1,5 M Tris pH 6,8
400 µL 10 %-SDS	200 µL 10 %-SDS
400 µL 10 %-APS	200 µL 10 %-APS
20 µL TEMED	40 µL TEMED

2.7.2. Western Blot (semi-dry)

Ein Western Blot dient dem immunologischen Nachweis von Proteinen. Dazu werden Proteine elektrophoretisch von einem SDS-PAGE auf eine Membran übertragen. Die gängigsten Membranen bestehen aus Nitrocellulose oder PVDF (Polyvinylidenfluorid). Beide Sorten sind in ihrer Sensitivität vergleichbar. PVDF-Membranen werden vor dem Blotten mit mindestens 70 %-Alkohol aktiviert. Der überschüssige Alkohol muss durch Waschen mit Blotting Puffer wieder aus der Membran gewaschen werden.

Bei dem semi-dry Western Blot wird das zu blottende Gel und eine Membran zwischen mit Blotting Puffer angefeuchteten Filterpapieren gelegt (Abbildung 7). In Abhängigkeit der Gelgröße wurde die Stromstärke ($1,2 \text{ mA/cm}^2$) für 90 Minuten angelegt, wobei die Proteine auf die Membran übertragen wurden.

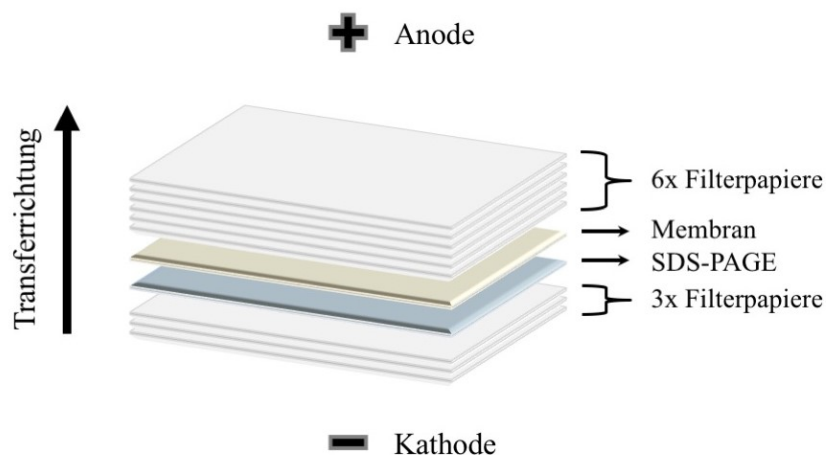


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines semi-dry Western Blots

Der Blotvorgang wurde durch die reversible Färbung der Proteine für 5 Minuten mit PonceauS überprüft. Nach dem Entfärben mit PBS-T (PBS + 0,05 % Tween-20) erfolgte die Blockierung der freien Bindestellen auf der Membran mit 10 %-Milchpulverlösung in PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Nach dem Blocken der Membran und zwischen den Antikörperinkubationen wurde die Membran jeweils für 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:1.000), welcher spezifisch an sein Antigen bindet, und dem sekundären Antikörper (1:1.000) erfolgte in PBS-T mit 1 % Milchpulver für 90 Minuten bei 4 °C. Nach erneutem Waschen mit PBS-T erfolgte die Detektion. Die verwendeten sekundären Antikörper waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 555 konjugiert. Der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper erlaubte eine direkte Detektion mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners (λ_{em} 565 nm/ λ_{ex} 595 nm). In einem Einzelversuch wurde der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 594 verwendet, welche an dem Scanner mit λ_{em} 655 nm/ λ_{ex} 685 nm dokumentiert wurde.

2.7.3. ELISA

2.7.3.1. ELISA

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein immunologischer Nachweis und zeichnet sich im Gegensatz zu Blot-Verfahren durch eine größere Sensitivität und der Möglichkeit zu quantifizieren aus.

Alle Inkubations- und Waschschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Für die Immobilisierung wurden die nachzuweisenden Analyten in Karbonatpuffer verdünnt (Gesamtvolumen 200 μ L) und über einen Zeitraum von zwei Stunden in einer 96-well-Multititerplatte auf einem Schüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS-T (PBS + 0,05% Tween-20) wurde für eine Stunde mit PBS-T mit 2 % BSA blockiert und erneut mit PBS-T gewaschen. Der 90-minütigen Inkubation mit dem primären Antikörper (1:1.000) folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:1.000) für 60 Minuten, wobei zwischen den Inkubationsschritten mit PBS-T gewaschen wurde. Nach dem Waschen erfolgte der Nachweis des sekundären Antikörpers (Abbildung 8).

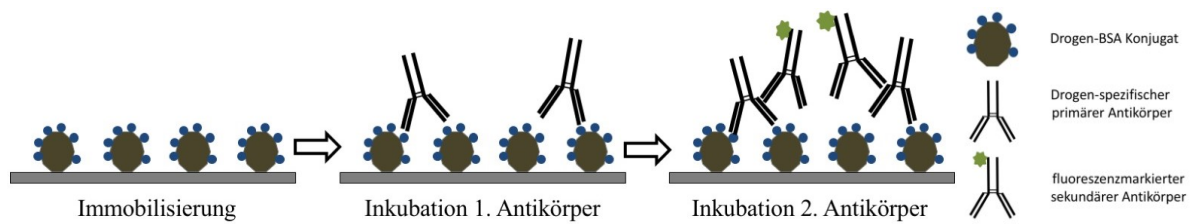


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines ELISAs. Die Drogen-BSA Moleküle werden in einer MTP immobilisiert und nach dem Blocken mit spezifischen primären und markierten sekundären Antikörpern detektiert.

Der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper wurde nach einem anschließenden Waschschrift direkt am Plattenreader ausgelesen (λ_{em} 565 nm/ λ_{ex} 595 nm). Die nachzuweisenden Proben wurden immer in Triplikaten in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Zusätzlich wurden folgende Kontrollen verwendet:

- BSA als Negativkontrolle in den selben Konzentrationen wie die Drogen-BSA-Konjugate
- Serum um Interaktionen der Antikörper mit Serumbestandteilen zu detektieren (Kreuzreaktivität und unspezifischer Hintergrund)
- der primäre Antikörper in einer 1:1.000-Verdünnung als Positivkontrolle für den Assay
- Karbonatpuffer zur Hintergrundkorrektur.

Für die Auswertung wurde von den Triplikaten der Mittelwert gebildet und der Mittelwert der Hintergrundsignale (Puffer) abgezogen.

2.7.3.2. Kompetitiver ELISA

Ziel der Etablierung eines kompetitiven ELISA war die quantitative Analyse von Drogen-positiven Serumproben. Dazu wurde zunächst eine Eichgerade erstellt. Das generelle Schema ist wie bei dem zuvor beschriebenen direkten ELISA (s. Abschnitt 2.7.3.1). Ab dem Inkubationsschritt mit dem spezifischen primären Antikörper unterschieden sich die Protokolle. Bei dem kompetitiven Ansatz wurde zur Erstellung einer Eichgeraden ein Gemisch bestehend aus Serum, primären Antikörper und einer definierten Konzentration Droge hergestellt. Diese Lösung wurde für einen kurzen Zeitraum (10 - 30 Minuten) auf einem Schüttler inkubiert und anschließend in die jeweilige Kavität der MTP gegeben. Nach der folgenden Inkubation mit dem sekundären Alexa-Fluor 555 markierten Antikörper wurde die Platte mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders ausgelesen. Die Abbildung 9 zeigt einen schematischen Aufbau eines kompetitiven ELISAs.

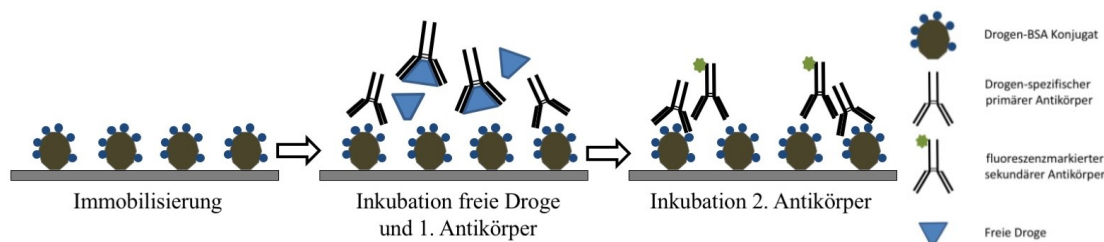


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines kompetitiven ELISAs. Die Drogen-BSA Moleküle werden in einer MTP immobilisiert und anschließend mit spezifischen primären Antikörpern und freier Droge inkubiert. Der Nachweis erfolgt über einen markierten sekundären Antikörper.

Da ein kompetitiver Ansatz verwendet wurde, nimmt mit steigenden Drogenkonzentrationen die Signalstärke ab, d.h. die Messwerte verhalten sich invers proportional zur Drogenkonzentration. Es wurden bis zu 10 verschiedene Drogenkonzentrationen jeweils in Triplikaten verwendet, um eine verlässliche Eichgerade zu erhalten. Als Positivkontrollen wurden die beiden Antikörper und als Negativkontrollen unverdünntes Serum und der Karbonatpuffer (Puffer ebenfalls in Triplikaten) mitgeführt. Der Mittelwert des Puffers wurde als Hintergrund gesetzt und von den Mittelwerten der Eichgerade subtrahiert. Für die Quantifizierung vom Landeskriminalamt bereitgestellter Serumproben wurden diese unverdünnt mit dem jeweiligen primären Antikörper versetzt, unter Schütteln 10 Minuten inkubiert und anschließend in eine mit Drogen-BSA Konjugat beschichtete Kavität gegeben. Diese Serumproben wurden ebenfalls in Triplikaten vermessen. Zur Bestimmung der Konzentration wurde der Messwert als y in die ermittelte Eichgerade (Formel: $y = mx + n$) eingesetzt. Dazu wurde nur der lineare Bereich der Eichgeraden verwendet.

2.7.3.3. Kompetitiver ELISA mit Drogen- oder Antikörpermix

Um die Stabilität des Drogennachweises zu testen und die generelle Machbarkeit eines parallelen Nachweises zu untersuchen, wurden während der Inkubation mit dem primären Antikörper verschiedene Drogen mit dem zu untersuchenden drogenspezifischen Antikörper oder eine Droge mit unterschiedlichen primären Antikörper eingesetzt. Bei dem Drogenmix wurden dazu alle neun in dieser Arbeit verwendeten Drogen in der gleichen Konzentrationsreihe hinzugegeben. Dies bedeutet, dass bei einer angegebenen kompetitiven Drogenkonzentration von 100 ng/mL, jeweils jede Droge in dieser Menge appliziert wurde und damit letztendlich eine Gesamtkonzentration von 900 ng/mL Drogen erreicht wurde. Dieser Ansatz sollte zeigen, inwiefern der jeweilig untersuchte primäre Antikörper aus einem komplexen Gemisch seinen Analyten binden konnte. Ein weiterer Ansatz war die Untersuchung, ob der Einsatz eines Gemisches aus mehreren drogenspezifischen Antikörpern Einfluss auf das Messergebnis hat. Dazu wurden die primären Antikörper in ihrer jeweiligen

Verdünnung zum Serum und der freien Droge gegeben. Wenn kein Effekt zu beobachten ist, könnte für einen späteren Test ein Master-Mix der primären Antikörper verwendet werden, was zu einer Vereinfachung des Protokolls und Minimierung der verschiedenen Lösungen führen würde. Bei beiden Ansätzen wurde ein direkter Vergleich mit dem kompetitiven ELISA angestellt. Zusätzlich wurden die Versuche mindestens einmal wiederholt.

2.7.3.4. Bestimmung der Antikörperspezifität im ELISA-Format

Zusätzlich zum weit verbreiteten Western Blot wurde das Prinzip in eine MTP übertragen. Dadurch konnten die Erkenntnisse aus den Western Blot Experimenten bestätigt bzw. erweitert werden. Zusätzlich können mit diesem Ansatz bis zu 8 Antikörper gleichzeitig in kürzerer Zeit hinsichtlich ihrer Spezifität getestet werden. Dazu wurden von jedem der 9 Drogen-BSA Konjugate 500 ng in der MTP immobilisiert. Zusätzlich wurde der zu testende Antikörper (500 ng) als Positivkontrolle und BSA (ebenfalls 500 ng) und Serum als Negativkontrollen immobilisiert. Anschließend wurde eine Inkubation mit dem verdünnten primären Antikörper in Serum oder in 2 % BSA in PBS-T durchgeführt. Nach anschließender Detektion über den Alexa Fluor 555 gelabelten sekundären Antikörper wurde die Platte ausgelesen. Als Hintergrund wurde der Wert des Karbonatpuffers genommen. Anhand der Messwerte konnte eine Aussage über die Spezifität des untersuchten Antikörpers getroffen werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde der Antikörper entweder verworfen oder im ELISA weiterverwendet.

2.7.3.5. ELISA mit Drogen-positiven Serumproben zur Immobilisierung

Parallel zu den oben beschriebenen ELISA-Methoden wurden darauf basierend andere Strategien getestet. Dies diente der Ergänzung der verwendeten Techniken und dem Versuch eine Methode zu etablieren bei der mit steigender Drogenmenge auch ein zunehmendes Signal einhergeht.

Es wurde überprüft, ob die Lösung bestehend aus Serum und reiner Droge zur Immobilisierung für einen ELISA genutzt werden kann. Nach der Beschichtung von 2 Stunden, wurde für 60 Minuten mit 2 % BSA blockiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper folgte der Nachweis mit dem markierten sekundären Antikörper. Alle Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler statt. Zwischen den Schritten wurde jeweils dreimal mit PBS-T gewaschen. Die Dokumentation erfolgte am Plattenreader (λ_{em} 565 nm/ λ_{ex} 595 nm).

Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen, von dessen Intensitäten der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt wurde.

2.7.4. Herstellung und Prozessierung eines Microarrays

Der Microarray ist eine Methode, um eine große Datenmenge bei einem geringen Einsatz an Material zu erhalten. Um den Durchsatz eines Drogentests und die parallele Detektion mehrerer Drogen zu ermöglichen, wurde der kompetitive Ansatz auf modifizierte Glas-Objektträger übertragen. Dazu wurden Epoxy-modifizierte Objektträger, welche vor Ort hergestellt wurden, verwendet. Für die Immobilisierung der Proben auf den Objektträgern wurde ein non-contact Spotter mit einer Piezo-Nozzle verwendet. Dieses System erlaubt die Abgabe sehr geringer Volumina und damit die Erhöhung der Probendichte auf der Oberfläche. Vor dem Spotvorgang wurden jeweils 40 µL der Proben in eine 384-well-MTP gegeben. Jedes Drogen-BSA Konjugat, die jeweiligen primären Antikörper (1:100), Karbonatpuffer, BSA (1 µg/mL), Serum (1:500) und der sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper (1:100) wurden immobilisiert. Die Konzentration der Konjugate orientierte sich am Protokoll der kompetitiven ELISAs, d.h. die eingesetzten Mengen lagen zwischen 100 ng/mL (THC-BSA) und 1 µg/mL (MDMA-BSA). Das Standardserum wurde hier verdünnt eingesetzt, da sonst durch die hohen Proteinmengen die Düse der Nozzle verstopfen würde. Der Spotter wurde so programmiert, dass pro Objektträger 16 identische Felder gespottet wurden. In jedem Feld wurde der sekundäre Antikörper in 3 von 4 Ecken immobilisiert, um als Marker für die Orientierung und für die Qualitätskontrolle zu fungieren. Pro Feld wurden bis zu 100 Analyten immobilisiert, wobei jede Probe mindestens als Triplikat mitgeführt wurde. In der Abbildung 10 ist der schematische Aufbau eines Objektträgers dargestellt.

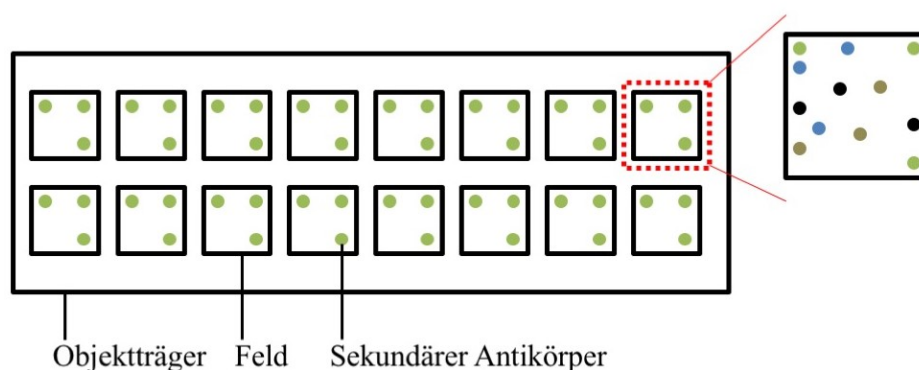


Abbildung 10: Aufbau eines Objektträgers. Auf der Oberfläche werden 16 identische Felder immobilisiert. In 3 von 4 Ecken wurde der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper (grün) als Qualitätskontrolle und für die Orientierung immobilisiert. Pro Feld können bis zu 100 Proben immobilisiert werden. Dazu gehören die Drogen-BSA Konjugate (braun), Negativkontrollen, wie z.B. Karbonatpuffer (blau), und primäre Antikörper (schwarz).

Die Einstellungen der Nozzle wurden so festgelegt, dass ein einzelner Tropfen ein Volumen von 150 pL hatte. Pro Analyt wurden 10 Tropfen abgegeben, was zu einem Gesamtvolumen von 1,5 nL pro Spot führte. Zwischen den einzelnen Proben wurde die Nozzle von außen und innen gespült/gewaschen, um eine Verschleppung von Probenmaterial zu verhindern. Die erste und letzte abgegebene Probe war der Karbonatpuffer, um potentielle Verschleppungen der Proben zu detektieren. Wurde während der Versuche die gleiche Signalintensität gemessen, konnte davon ausgegangen werden, dass keine Kontamination stattfand. Sobald der Spotdurchgang abgeschlossen war, wurden die Slides dokumentiert, um die Qualität der Eckpunktmarker zu kontrollieren. Nach der Dokumentation wurden die Objektträger Vakuumverschweißt und mindestens über Nacht bei 4 °C gelagert. Sobald ein Objektträger für Experimente verwendet werden sollte, wurde dieser aus der Verpackung entnommen, mit PBS-T gewaschen und in die 16-Kammer-Systeme gespannt. Diese wurden dazu verwendet, um für jedes gespottete Feld einen Inkubationsraum zu schaffen. Dadurch konnten pro Objektträger 16 verschiedene Versuchsbedingungen getestet werden. Die Abbildung 11 zeigt ein solches System.

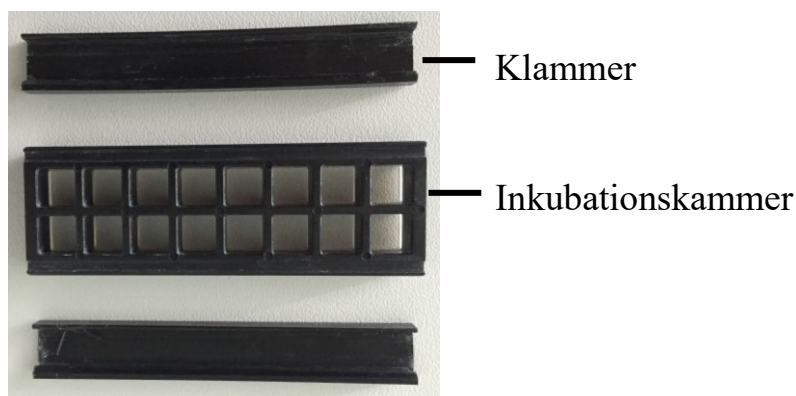


Abbildung 11: 16-Kammer-System der Firma Sigma-Aldrich. Das Kammer-System wird auf die bespottete Oberfläche des Objektträgers gelegt und mit den 2 Klammern fixiert und damit gleichzeitig abgedichtet.

Als nächster Schritt folgte die Absättigung freier Bindestellen mit einem Blockierschritt für 60 Minuten. Es wurden verschiedene Blockierlösungen getestet: 2 % BSA, unverdünntes Serum und Ethanolamin. Anschließend wurden die Kammern für 90 Minuten mit dem primären Antikörper inkubiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurde der jeweilige Antikörper in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Die Verdünnung wurde in PBS-T oder in Serum hergestellt. Abschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper für 60 Minuten in einer 1:1.000-Verdünnung in PBS-T. Nachdem der Objektträger aus der Halterung entfernt und getrocknet wurde, wurde das Ergebnis dokumentiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde viermal mit PBS-T gewaschen. Der komplette Versuch wurde bei

Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 650 rpm durchgeführt. Die Dokumentation der Microarrays wurde mit einem Fluoreszenzscanner von Molecular Devices durchgeführt, welcher eine hochauflösende Bilddatei liefert. Es wurde der grüne Laser (Transmissionsfilter λ : 550 nm – 600 nm), mit 40 % Stärke, 400 PMT (Photomultiplier) und eine Auflösung von 10 μ m verwendet. Die Auswertung der Bilder wurde mit GenePix Pro 7 durchgeführt. Mit Hilfe der Software können die einzelnen Felder markiert werden. Anschließend berechnet das Programm die Signalintensitäten, sowie den lokalen Hintergrund und einige statistische Werte wie u.a. den Mittelwert, Median, Standardabweichung und das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis.

2.7.5. Nachweis über Aptamere

Neben einem immunologischen Nachweis wurde versucht, Kokain mittels Aptamere zu detektieren. Aptamere sind kurze einzelsträngige Oligonukleotide. Die hier verwendeten Sequenzen stammen aus der Publikation von Cekan *et al.* [91]. Methodisch erfolgte der Nachweis anhand eines EMSAs (Electro Mobility Shift Assay). Dabei werden die Aptamere (DNA) mit steigenden Mengen Analyt inkubiert. Bei einer Interaktion bilden sich Komplexe, welche auf einem Agarosegel ein verändertes Laufverhalten aufweisen sollten. Dazu wurde 5 pmol des Aptamers mit steigenden Mengen Kokain inkubiert. Die Mengen an Kokain wurden so gewählt, dass zunächst ein Verhältnis zwischen DNA und Kokain von 1:1 herrschte und dann schrittweise bis 1:100 erhöht wurde. Die einzelnen Ansätze wurden für 30 Minuten bei 25 °C inkubiert und anschließend mit Glycerin versetzt und auf ein 1,5 % Agarose-Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 0,5xTBE und als Spannung 70 V gewählt. Die Dokumentation erfolgte mittels eines Fluoreszenzscanners (λ_{em} 565 nm/ λ_{ex} 595 nm).

2.7.6. Statistik

Jede Probe wurde in einem unabhängigen Versuch als Triplikat vermessen. Von diesen Werten wurde der Mittelwert/Median gebildet. Zusätzlich zum Mittelwert bzw. Median wurde für jede Probe mit den drei Messwerten die Standardabweichung ermittelt. Diese soll Auskunft über die Zuverlässigkeit der jeweiligen Messwerte geben. Bei ausreichend vorhandenen Messwerten wurde zusätzlich der Variationskoeffizient berechnet. Damit können Aussagen über die Reproduzierbarkeit getroffen werden.

Signale wurden als positiv bewertet, sobald ein Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (SNR-Verhältnis) von 3 erreicht wurde. Das SNR-Verhältnis ergibt sich aus dem Mittelwert des Puffers addiert mit dessen dreifacher Standardabweichung.

Bezüglich der Bewertung der Ergebnisse wurden die Richtlinien der GTFCh und der Bundesärztekammer hinzugezogen. In diesen Richtlinien werden Vorgaben bezüglich der Grenzwerte, der Standardabweichung und der Reproduzierbarkeit festgelegt.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, wird sich an folgender Abbildung 12 orientiert. Diese stellt die zu beachtenden Punkte einer Antikörpervalidierung dar. Da die Spezifität der Antikörper ausschlaggebend für die Qualität eines immunologischen Nachweises ist, wurde viel Wert auf die Analyse derselben gelegt. Zusätzlich wurde der Einfluss des Probenmaterials, in diesem Fall Serum, untersucht, um Einflüsse auf das Messergebnis ausschließen zu können. Nach der Optimierung der Versuchsbedingungen, wie z.B. eingesetzte Antikörpermengen, wurde der im ELISA etablierte Ansatz auf Microarrays übertragen. Dies diente der Erhöhung des Probendurchsatzes und der Möglichkeit mehrere Proben bzw. Drogen parallel vermessen zu können.

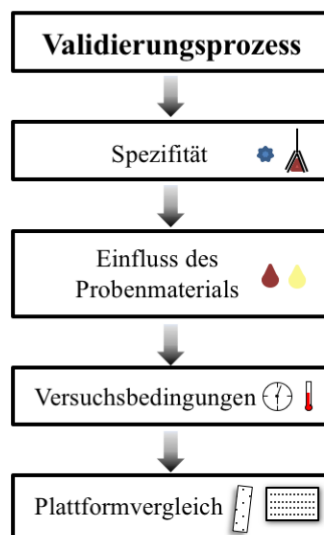


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs. Zunächst werden die Antikörper auf einen spezifischen Nachweis ihres Analyten untersucht. Mit diesen Antikörpern wird der Einfluss des Probenmaterials (Serum) auf die Messung und Reagenzien überprüft. Anschließend werden die Versuchsbedingungen wie z.B. Antikörpermenge optimiert und vom LKA bereitgestellte Proben vermessen. Für einen parallelen Nachweis wurde der ELISA auf einen Microarray übertragen. Die erzielten Ergebnisse beider Methoden werden miteinander verglichen.

Da mit einer Vielzahl verschiedener Analyten bzw. Antikörpern gearbeitet wurde, werden in diesem Abschnitt Ergebnisse exemplarisch dargestellt. Der Vollständigkeit halber werden alle übrigen Ergebnisse im Anhang gezeigt.

3.1. Alternative Versuchsansätze zum Drogennachweis

Neben kompetitiven ELISAs stehen Alternativen zum Drogennachweis zur Verfügung. Dazu gehört die Verwendung von Aptameren. Diese Alternative hat den Vorteil, dass bei einem

positiven Drogenbefund steigende Signale messbar sind. Die Verwendung von Aptameren bietet den Vorteil, dass diese relativ schnell und günstig hergestellt werden können. Durch die Synthese (SELEX-Verfahren) können Modifizierungen in die Sequenz eingebaut werden und es wird auf Tierversuche bei der Herstellung verzichtet.

3.1.1. Aptamere

Zunächst wurde der Drogennachweis über Aptamere getestet (Abbildung 13). Dazu wurden zwei verschiedene Aptamere mit steigenden Mengen freiem Kokain inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

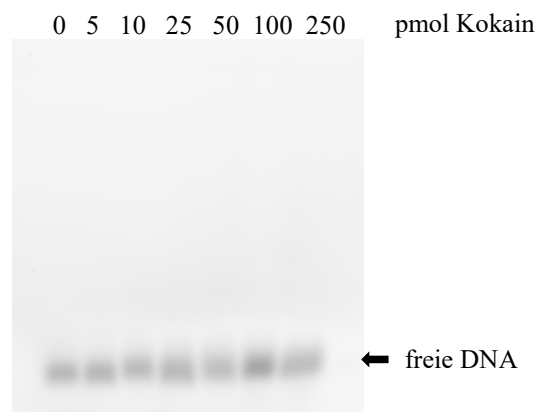


Abbildung 13: Ergebnis eines Nachweises von Kokain über ein Aptamer. 5 pmol des Aptamers wurden mit steigenden Mengen freien Kokains inkubiert bis ein Verhältnis von 1:50 erreicht war. Das Agarosegel wurde nachträglich mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt.

Die Abbildung 13 zeigt das Gelbild einer Inkubation von Kokain mit dem Aptamer I (5'-6FAM-GAC AAG GAA AAT CCT TCA ATG AAG TGG GTC). Das Gelbild der Inkubation mit Aptamer II befindet sich im Anhang (Abbildung 55). Bilden das Aptamer I und das freie Kokain einen Komplex, sollte sich dessen Laufverhalten im Agarosegel auf Grund von Strukturveränderungen verändern. Auf dem Bild sind Banden für das Aptamer I in vergleichbaren Intensitäten in allen Spuren zu erkennen. Es konnten keine Komplexe aus Aptamer I und Droge nachgewiesen werden. Da die freie Droge in einem bis zu 50-fachen Überschuss zum Aptamer I eingesetzt wurde, wurde der Nachweis als nicht erfolgreich bewertet.

3.1.2. Alternative ELISA-Strategien: Serum zur Immobilisierung

Als weiterer Ansatz wurde gespiktes Serum zur Immobilisierung verwendet (Abbildung 14). Dazu wurde Serum mit 1 µg/mL reinem MDMA versetzt und in die MTP gegeben. Anschließend wurden die Antikörperinkubationen durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, ob Drogen-positive Seren, wenn diese zur Immobilisierung genutzt werden, einen direkten Nachweis mittels einem ELISA erlauben.

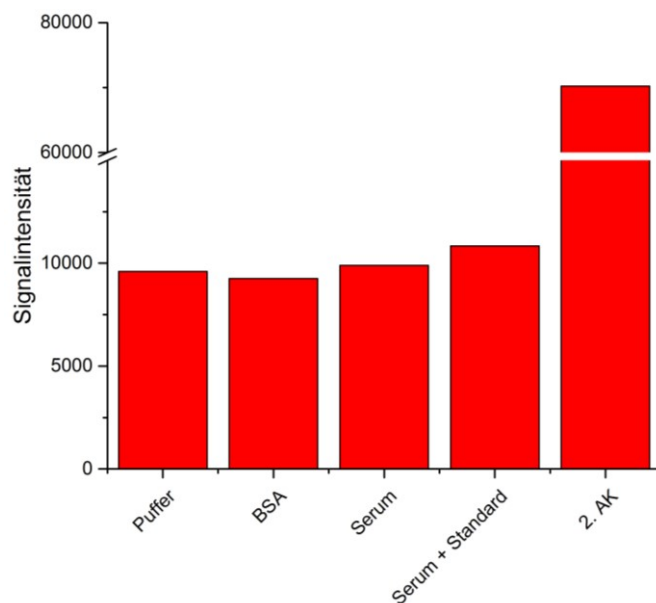


Abbildung 14: Nachweis von MDMA nach Immobilisierung von gespikten Serum. Dem Serum wurde 1 µg/mL reines MDMA hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper MD1 und dem sekundären Antikörper.

Das Ergebnis zeigt, dass ein Nachweis von Drogen in Serum, wenn dieses zur Immobilisierung verwendet wird, nicht möglich ist. Das Signal des gespikten Serums (Serum + Standard) entspricht den Signalen der Negativkontrollen, wie z.B. dem Puffer oder Serum. Anhand dieser Ergebnisse wurde dieser Ansatz ebenfalls verworfen.

Anhand der in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse (Abbildung 13 und Abbildung 14) wurde der Fokus auf einen immunologischen Nachweis gesetzt. Dies bedeutet, dass eine Quantifizierung mit Hilfe eines kompetitiven ELISAs bewerkstelligt werden sollte. Dafür wurde zunächst eine intensive Qualitätskontrolle der Antikörper durchgeführt. Diese diente vor allem der Überprüfung der Spezifität, aber auch der Sensitivität der verwendeten Antikörper.

3.2. Qualitätskontrolle der Antikörper und Drogen-BSA Konjugate

Die Qualitätskontrolle der verwendeten Antikörper wurde mittels zwei Methoden durchgeführt. Die Versuche dienten zur Qualitätskontrolle der getesteten Antikörper bezüglich ihrer Spezifität. Bei neu gelieferten Antikörpern wurde auf die Vergleichbarkeit mit vorigen Ergebnissen geachtet. Dies traf auch auf Lösungen aus demselben Batch zu.

3.2.1. SDS-PAGE und Western Blot

Zunächst wurde standardmäßig ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die 9 Drogen-BSA Konjugate bzw. die primären Antikörper und die Negativkontrollen Serum und BSA auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Nach dem Übertrag auf eine PVDF-Membran und der Überprüfung des Transfers durch eine PonceauS-Färbung wurden freie Bindestellen auf der Membran abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den zu untersuchenden primären Drogen-spezifischen Antikörper und die Detektion mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Zur Kontrolle der Konjugate und der primären Antikörper wurden die SDS-PAGE zusätzlich mit Coomassie angefärbt (Abbildung 15).

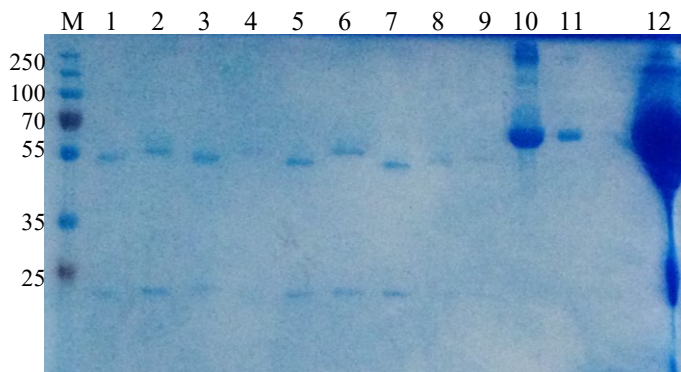


Abbildung 15: Eine Coomassie gefärbte SDS-PAGE der primären Antikörper: M = Marker; 1 = Amphetamin-AK; 2 = Methadon-AK; 3 = Morphin-AK; 4 = Kokain-AK; 5 = THC-AK; 6 = Methamphetamin-AK; 7 = Benzoyllecgonin-AK; 8 = PCP-AK; 9 = MDMA-AK; 10 = HRP-AK; 11 = BSA; 12 = Serum (1:10). Pro Spur wurden 300 ng aufgetragen.

Es sind sowohl die schwere (50 kDa) und die leichte (25 kDa) Ketten der primären Antikörper in Abbildung 15 zu erkennen. Diese sind jedoch in unterschiedlicher Intensität sichtbar, obwohl die Antikörper konzentrationsnormiert (jeweils 300 ng) eingesetzt wurden. Neben den distinkten Banden ist in Spur 12, in der das Serum aufgetragen wurde, eine deutliche Bande durch das humane Albumin zu erkennen. Die unterschiedlichen Intensitäten könnten darauf hinweisen, dass nicht alle Antikörper als Gesamtmolekül aus leichter und schwerer Kette

vorliegen. Um die Qualität der primären Antikörper und um einen geeigneten sekundären Antikörper auszuwählen, wurde eine solche SDS-PAGE auch zum Blotten verwendet. Es wurden sekundäre Antikörper, die mit unterschiedlichen Alexa-Farbstoffen konjugiert sind und in verschiedenen Wellenlängen ausgelesen werden können, getestet. Die Auswahl der Farbstoffe erfolgte nach den vor Ort existierenden Auslesegeräten. Ziel war es, einen sekundären Antikörper auszuwählen, der sowohl die leichte, als auch die schwere Kette des Antikörpers erkennt, um eventuell eine bessere Sensitivität zu erreichen. Weiterhin sollten alle verwendeten primären Antikörper gleichmäßig erkannt werden. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis eines Western Blots für sekundäre Antikörper, welche mit den Farbstoffen Alexa 555 und Alexa 594 markiert waren.

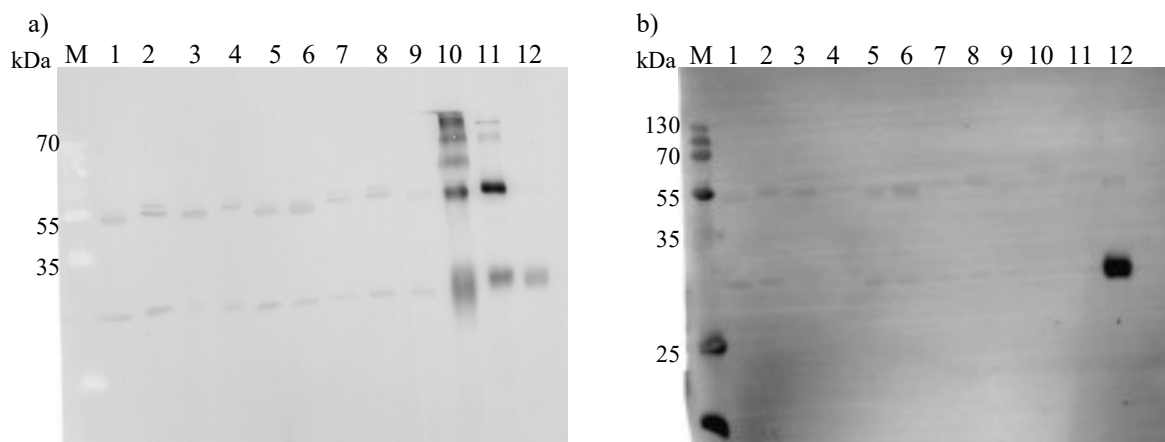


Abbildung 16: Nachweis getesteter primärer Antikörper mittels sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper. Es wurden 2 Antikörper mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen getestet. a) Alexa Fluor 555 und b) Alexa Fluor 594. M = Marker; 1 = Amphetamin-AK; 2 = Methadon-AK; 3 = Morphin-AK; 4 = Kokain-AK; 5 = THC-AK; 6 = Methamphetamin-AK; 7 = Benzoylcegonin-AK; 8 = PCP-AK; 9 = MDMA-AK; 10 = Alexa 555-AK; 11 = Alexa 594-AK; 12 = Cy3-AK. Pro Spur wurden 300 ng aufgetragen.

Auf beiden Blots (Abbildung 16a und b) ist in jeder Spur jeweils wieder die leichte und die schwere Kette der Antikörper zu erkennen. Bei den aufgetragenen sekundären Antikörpern (Spur 10 - 12) sind noch weitere Banden bzw. in Spur 12 lediglich die leichte Kette des sekundären Antikörpers zu detektieren. Beide Farbstoffe unterscheiden sich vor allem in der jeweiligen Intensität, in der der Nachweis der primären Antikörper erfolgt. Besonders im Erkennen der leichten Kette scheint der Antikörper mit dem Farbstoff Alexa 594 schlechtere Ergebnisse zu erzielen. Anhand dieser Western Blots wurde geschlussfolgert, dass der mit Alexa Fluor 555 markierte sekundäre Antikörper einen sensitiveren Nachweis der primären Antikörper ermöglicht. Daher wurde für alle zukünftigen Experimente der sekundäre Antikörper markiert mit Alexa Fluor 555 genutzt.

Als nächstes wurden die einzelnen primären Antikörper überprüft. Die folgenden Abbildungen zeigen die SDS-PAGE (Abbildung 17) und Beispiele für spezifische (Abbildung 18) und unspezifische (Abbildung 19) Antikörper.

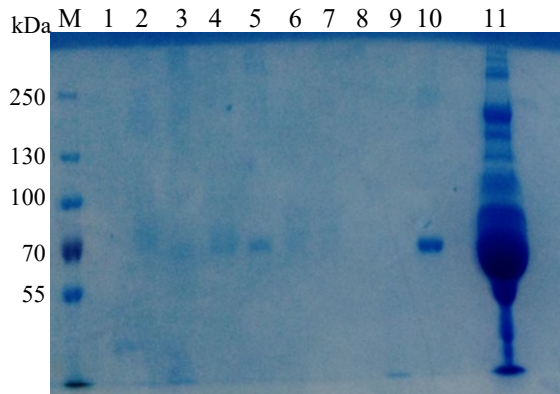


Abbildung 17: Eine Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Drogen-BSA Konjugate: M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoylcegonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamin-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = BSA; 11 = Serum (1:10). Pro Spur wurden 300 ng aufgetragen.

In der Abbildung 17 ist zu erkennen, dass die Drogen-BSA Konjugate keine distinkte Bande liefern. Meist ist ein „Schmier“ über einen Großteil der Spur, vor allem im hochmolekularen Bereich, zu erkennen. Nur bei einigen Konjugaten lässt sich auf der Höhe von BSA (66 kDa) eine schwache Bande erkennen. Dieses Ergebnis deutet auf eine Quervernetzung des BSAs bei der Konjugation hin. Auch hier ist in Spur 11, in der das Serum aufgetragen wurde, eine deutliche Bande durch das Albumin zu erkennen.

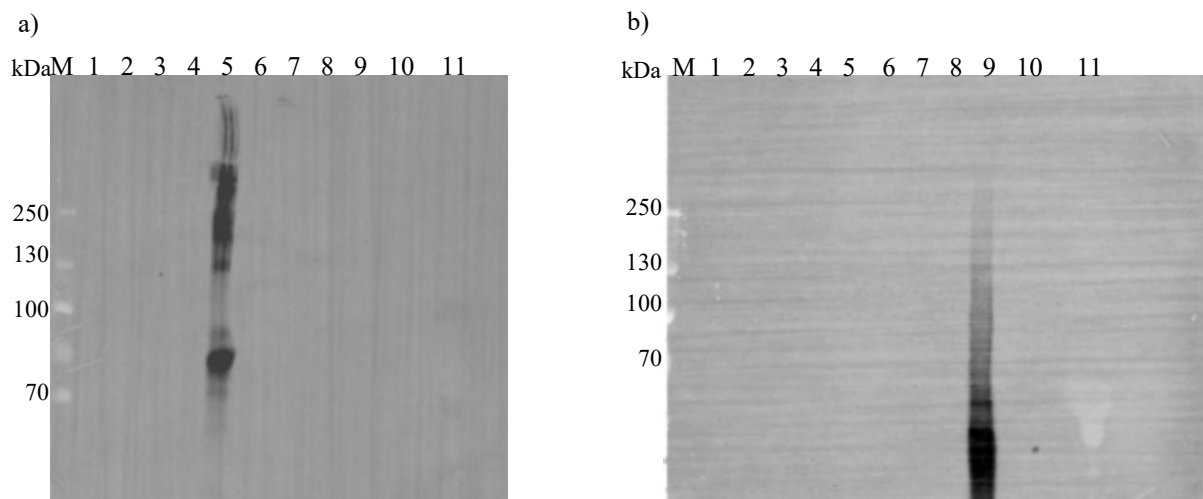


Abbildung 18: Ergebnisse eines Western Blots mit spezifischen Nachweis der Drogen-BSA Konjugate a) THC-BSA mit dem Antikörper T1 und b) PCP-BSA mit dem Antikörper P1. M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoylcegonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamin-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = BSA; 11 = Serum (1:10). Es wurden 300 ng pro Spur aufgetragen.

Bei beiden Western Blots ist nur in jeweils einer Spur ein deutliches Signal zu erkennen. Wie bereits bei der SDS-PAGE gezeigt (Abbildung 17), zeigen die Drogen-BSA Konjugate keine distinkte Bande, sondern laufen größtenteils über die komplette Spur. Bei einigen Konjugaten, wie zum Beispiel THC (Abbildung 18a), ist ein markanteres Signal auf Höhe von BSA

(66 kDa) zu sehen. Weiterhin ist auf beiden Membranen in Spur 11 ein heller Schatten zu erkennen. Dieser Schatten wird durch das Serum verursacht, welcher mit bloßem Auge vor der Dokumentation auf der Membran beobachtet werden konnte. Da kein Signal durch die verwendeten Antikörper vorliegt, d.h. keine Färbung, liegt keine Kreuzreaktivität mit Serum vor. Während der Qualitätskontrolle wurden für viele Antikörper unspezifische Bindungen dokumentiert. Im Folgenden werden zwei Beispiele gezeigt (Abbildung 19).

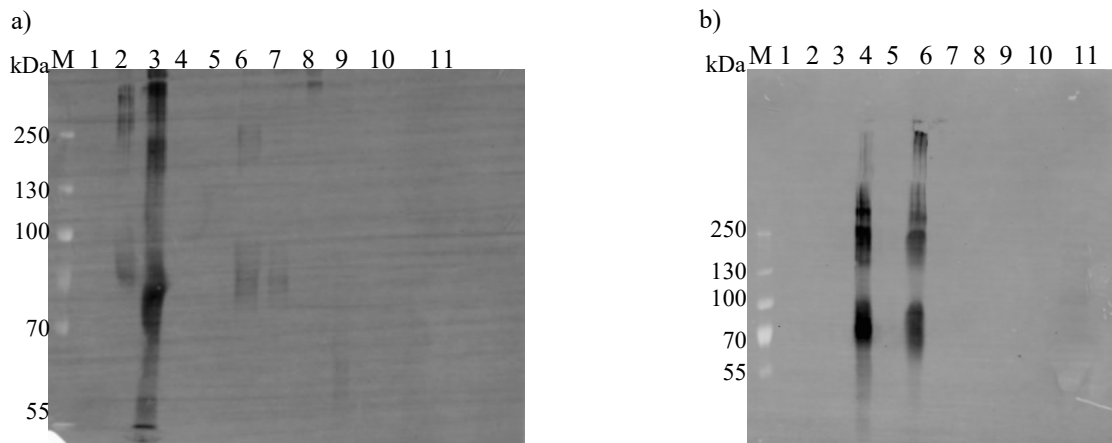


Abbildung 19: Ergebnisse eines Western Blots mit dem a) Antikörper Mo1 gegen Morphin und b) K2 gegen Kokain. Gut zu erkennen sind diverse Signale und die damit verbundene Kreuzreaktivität. M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoyllecgonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamin-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = BSA; 11 = Serum (1:10). Pro Spur wurden 300 ng aufgetragen.

Die Ergebnisse der Western Blots zeigen unterschiedliche Formen von Kreuzreaktivitäten. Der anti-Morphin Antikörper Mo1 (Abbildung 19a) liefert ein starkes Signal für Morphin-BSA, aber auch mehrere unspezifische Bindungen an verschiedene Drogen, wie z.B. Methadon-BSA, Benzoyllecgonin-BSA und MDMA-BSA. Die nachgewiesenen Drogen gehören mehreren Substanzklassen an und unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur. Die Abbildung 19b zeigt den Nachweis mit dem anti-Kokain Antikörper K2. Auf der Membran sind deutliche Signale für Kokain-BSA und Benzoyllecgonin-BSA zu erkennen. Benzoyllecgonin ist das Hauptabbauprodukt von Kokain. In diesem Fall waren keine weiteren Kreuzreaktivitäten zu beobachten. Das bedeutet, dass der Antikörper spezifisch für die Substanzklasse ist, aber nicht geeignet für einen spezifischen Nachweis einzelner Drogen. Auch hier ist wieder der bereits erwähnte Schatten vom Serum zu sehen, welcher ebenfalls keinem Signal entspricht.

Antikörper, die eine Kreuzreaktivität gegenüber anderen Drogen-BSA Konjugaten, BSA oder Serum zeigten, wurden von einem weiteren Validierungsprozess ausgeschlossen. In Summe wurden 16 Antikörper mit Western Blot hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht. Davon zeigten 6 primäre Antikörper keine Kreuzreaktivitäten und konnten für weitere Versuche genutzt werden.

3.2.2. ELISA

Parallel wurde eine weitere Methode verwendet um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen. Dazu wurde ein Western Blot in einen ELISA übertragen. Hierfür wurden in einer Reihe einer 96-well MTP die 9 Drogen-BSA Konjugate, BSA, Serum und der zu untersuchende Drogen-spezifische primäre Antikörper immobilisiert. Neben einer Untersuchung der Spezifität konnte der Durchsatz erhöht werden. Weiterhin könnte durch das Auftreten des „Schmiers“ im Western Blot und der damit verbundenen Verteilung der Probe über die gesamte Spur die getroffenen Aussagen unzuverlässig sein. Es wäre daher möglich, dass dadurch einige Signale unter der Nachweisgrenze lagen und damit spezifische Signale bzw. Kreuzreaktivitäten nicht detektiert wurden. Mit der Verwendung einer MTP konnten bis zu 8 primäre Antikörper gleichzeitig überprüft werden. Da in diesem Aufbau keine gesonderte Puffer Kontrolle mitgeführt wird, wurde zunächst überprüft, wie hoch der Hintergrund einer leeren Platte bzw. der Negativkontrollen ist (Abbildung 20).

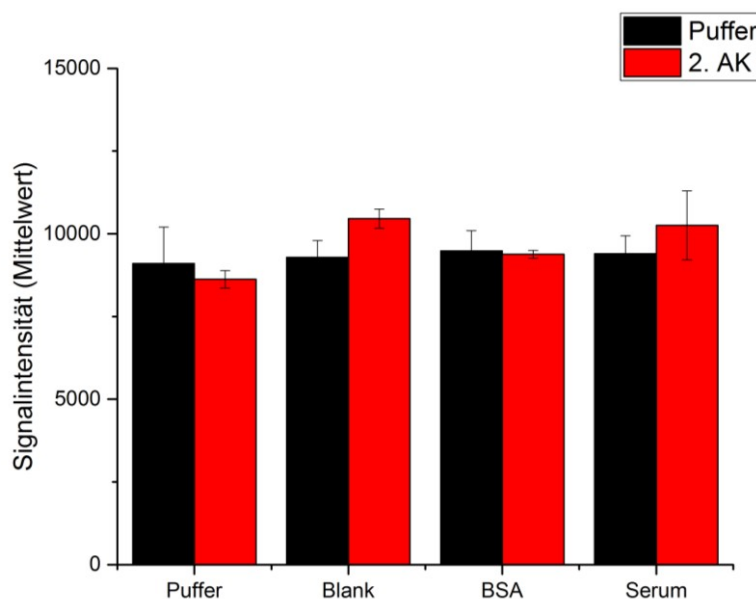


Abbildung 20: Überblick der Hintergrundsignale einer schwarzen 96-well MTP welche für alle ELISA Experimente verwendet wurde. Immobilisiert wurden Karbonatpuffer, BSA (500 ng) und Serum (unverdünnt), welche im ELISA als Negativkontrollen fungieren. Als weitere Kontrolle wurden leere Kavitäten (Blank) betrachten. Die wells wurden mit PBS-T (schwarz) und mit dem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper (1:1.000; rot) inkubiert. Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen, von denen der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet wurde.

Die Grafik zeigt, dass sich die Signale von Puffer, BSA und Serum auf einem ähnlichen Level bewegen. Auch scheint es keinen Unterschied zu machen, ob eine Inkubation der Platte mit Puffer oder sekundärem Antikörper stattfand. Dies bedeutet, dass keine Kreuzreaktivität oder Hintergrundsignale der Negativkontrollen mit dem sekundären Antikörper im Vergleich zum

Puffer nachzuweisen waren. Die erhaltenen Signale von ca. 10.000 Signalintensitäten entsprechen der Autofluoreszenz der verwendeten MTP. Daher könnte jede der Substanzen zur Hintergrundkontrolle herangezogen werden. Bei den folgenden Experimenten wurde BSA als Hintergrundkontrolle verwendet. Sobald die Signale für BSA und/oder Serum deutlich erhöht sind, muss von einer Kreuzreaktivität ausgegangen werden. Die Abbildung 21 und die Abbildung 22 zeigen exemplarisch die Ergebnisse für verschiedene Antikörper. Auch hier werden wieder spezifische mit kreuzreagierenden Antikörpern verglichen. Weitere Abbildungen von ELISAs zur Überprüfung der Antikörperspezifität sind im Anhang zu finden.

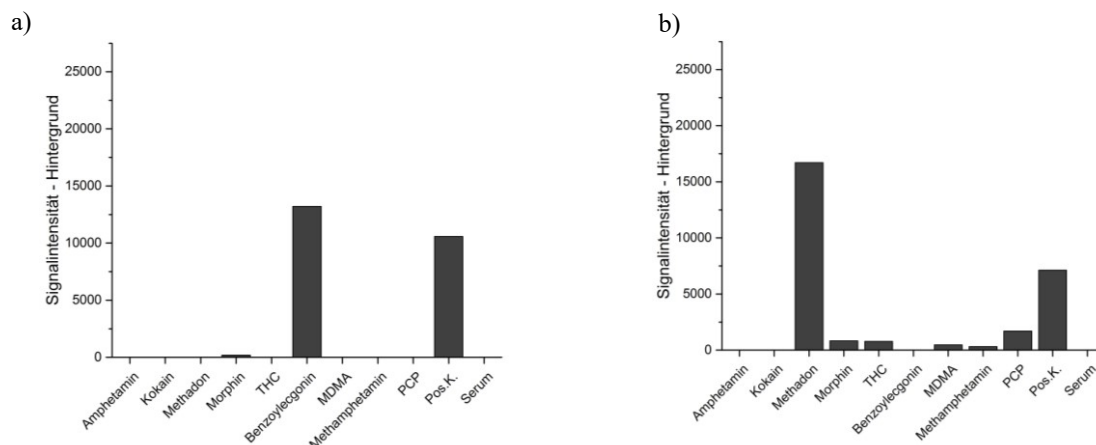


Abbildung 21: Ergebnis eines ELISAs mit spezifischen Nachweis der Drogen-BSA Konjugate a) Benzoylcegonin-BSA (Antikörper B1) und b) Methadon-BSA (Antikörper Mt1). Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

Die Abbildung 21 zeigt den spezifischen Nachweis für Benzoylcegonin-BSA und Methadon-BSA. Neben dem Drogen-BSA Konjugat lieferte der jeweils getestete primäre Antikörper, welcher als Positivkontrolle verwendet wurde, ein Signal. Beim Nachweis von Methadon-BSA (Abbildung 21b) sind weitere sehr schwache Signale für einige Drogen-BSA Konjugate zu erkennen, wie z.B. für Morphin-BSA. Auf Grund der geringen Signalintensitäten werden diese zunächst als Hintergrundrauschen eingestuft. Dies bedeutet, dass beide gezeigte Antikörper spezifisch an das jeweilige Drogen-BSA Konjugat binden.

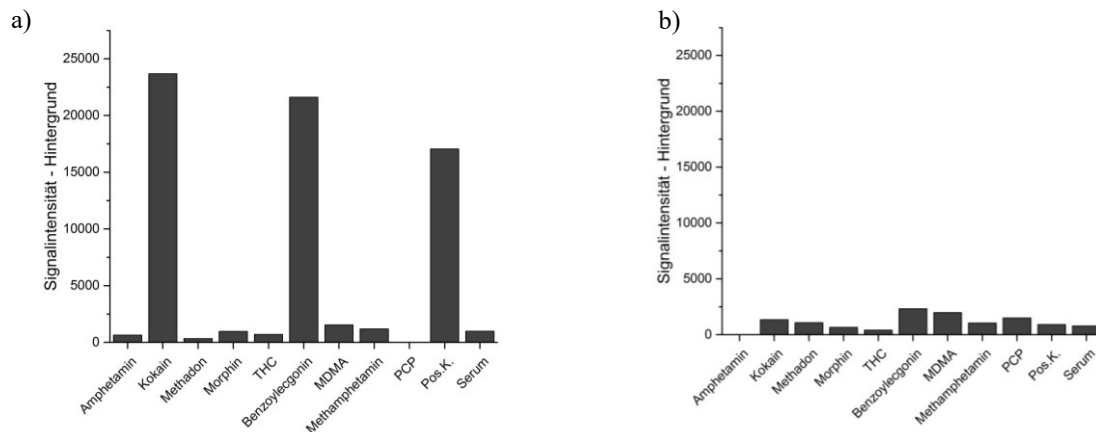


Abbildung 22: Ergebnis eines ELISAs mit Nachweis der Drogen-BSA Konjugate a) Kokain-BSA (Antikörper K1) und b) Morphin-BSA (Antikörper Mo3). Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper wurden in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt. Zu erkennen sind neben den spezifischen Signalen diverse unspezifische bzw. verhältnismäßig schwache Signale.

In der Abbildung 22 sind Ergebnisse für unspezifisch bindende Antikörper dargestellt. Der anti-Kokain Antikörper K1 lieferte neben der Positivkontrolle und Kokain-BSA auch ein Signal für Benzoyllecgonin-BSA. Auf Grund dieser Kreuzreaktivität wurde dieser Antikörper nicht für weitere Versuche zur spezifischen Detektion von Kokain-BSA verwendet. Da Benzoyllecgonin das Hauptabbauprodukt von Kokain ist, könnte der Antikörper K1 zum kompetitiven Nachweis von Kokain oder Benzoyllecgonin verwendet werden. Die Abbildung 22b zeigt die Überprüfung des anti-Morphin Antikörpers Mo3. Es wurden Signale bei mehreren Drogen-BSA Konjugaten gemessen, welche zudem sehr gering ausgefallen sind. Weiterhin war das Signal der Positivkontrolle (Antikörper Mo3) ebenfalls sehr schwach. Mit dem Antikörper Mo3 konnte im ELISA kein spezifischer Nachweis von Morphin-BSA erbracht werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zum Western Blot (siehe Anhang Abbildung 61b). Im Western Blot konnte das Morphin-BSA Konjugat spezifisch mit dem Antikörper Mo3 nachgewiesen werden. Da der Antikörper Mo3 lediglich nach der Probenvorbereitung das Konjugat erkennt, kann dieser in einem ELISA zur Quantifizierung von Drogen in Serumproben nicht eingesetzt werden. Es lässt sich schlussfolgern, dass erst durch die Behandlung der Probe im SDS-PAGE und der damit verbundenen Strukturveränderung der Antikörper Mo3 in der Lage ist, seinen Analyten zu binden.

Die Abbildungen 18 – 19 und 21 – 22 illustrieren den Unterschied zwischen spezifischen und unspezifischen Antikörpern und veranschaulichen die Bedeutung einer intensiven Qualitätskontrolle der Antikörper. Um die Ergebnisse aus Western Blot und ELISA besser vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse der beiden Methoden in Tabelle 12 gegenübergestellt.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Drogen-spezifischen Antikörper. Zusätzlich wurde eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von Western Blot und ELISA für jeweils denselben Antikörper vorgenommen. Die Spezifität der primären Antikörper wurde klassifiziert in: spezifisch (grün), Kreuzreaktivitäten innerhalb der gleichen Substanzklasse (gelb) und weitreichende Kreuzreaktivitäten bzw. keine Bindung des gewünschten Drogen-BSA Konjugats. Wenn ein Antikörper mit einer Methode nicht untersucht wurde, ist dies mit N/A gekennzeichnet. Abbildungen, welche nicht in diesem Abschnitt gezeigt wurden, befinden sich im Anhang (Abbildung 56 - Abbildung 74).

Antikörper	Immunogen	Western Blot	ELISA
A1	Amphetamin		N/A
A2	Amphetamin		
A3	Amphetamin	N/A	
A4	Amphetamin	N/A	
Me1	Methamphetamin		
Me2	Methamphetamin		N/A
Me3	Methamphetamin		N/A
Me4	Methamphetamin	N/A	
Me5	Methamphetamin	N/A	
Me6	Methamphetamin	N/A	
Me7	Methamphetamin	N/A	
Me8	Methamphetamin	N/A	
Me9	Methamphetamin	N/A	
Me10	Methamphetamin	N/A	
Me11	Methamphetamin	N/A	
Me12	Methamphetamin	N/A	
MD1	MDMA		
Mt1	Methadon		
P1	PCP		N/A
P2	PCP		
T1	THC		
T2	THC	N/A	
T3	THC	N/A	
Mo1	Morphin		N/A
Mo2	Morphin		N/A
Mo3	Morphin		
K1	Kokain		
K2	Kokain		N/A

K3	Kokain	N/A	
K4	Kokain	N/A	
K5	Kokain	N/A	
K6	Kokain	N/A	
B1	Benzoylcegonin		

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass beide Methoden zum Teil unterschiedliche Ergebnisse liefern. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden alle weiteren Antikörper nur mittels ELISA getestet. Neben einer detaillierten Aussage und Abstufung über mögliche Kreuzreaktivitäten entspricht das ELISA Format dem späteren Versuchsaufbau. Das bedeutet, dass sich die Ergebnisse leichter übertragen lassen. Alle Antikörper die im ELISA keine Kreuzreaktivität zeigten (grün) wurden für weitere Versuche verwendet. Die sowohl im ELISA, als auch im Western Blot rot gekennzeichneten Antikörper wurden verworfen, da für die weitere Arbeit ein spezifischer Antikörper, welcher eine einzelne Droge detektieren kann, benötigt wird. Dafür wurden einige Antikörper, die spezifisch für die Substanzklasse waren (gelb), in weiteren Experimenten genauer betrachtet. Es wurde untersucht, ob auch in einem kompetitiven Ansatz die gleichen Kreuzreaktivitäten auftreten. Nach der abgeschlossenen Qualitätskontrolle wurde als nächstes überprüft, ob die spezifischen Antikörper in der Lage sind die jeweilige freie Droge im Serum zu erkennen. In Summe wurden diese Experimente für 7 der ursprünglich 9 verwendeten Drogen durchgeführt.

3.3. Einfluss des Probenmaterials (Serum)

Bei der bis hierhin durchgeführten Antikörpervalidierung mit einem ELISA zur Überprüfung der Spezifität wurden sämtliche Verdünnungen der Antikörper in PBS-T angesetzt. Da das finale Probenmaterial im kompetitiven ELISA Serum ist, musste der Einfluss des Mediums nicht nur als immobilisierte Probe, sondern auch als Verdünnungslösung beachtet werden. Weder beim Western Blot, noch beim ELISA wurde eine Kreuzreaktivität der primären Antikörper mit dem Serum beobachtet (z.B. Abbildung 18 und Abbildung 21). Die Antikörper können sich jedoch anders verhalten, sobald die Verdünnung in Serum stattfindet. Die Abbildung 23 zeigt die Gegenüberstellung von Antikörper T2 in Puffer und Serum in einem ELISA.

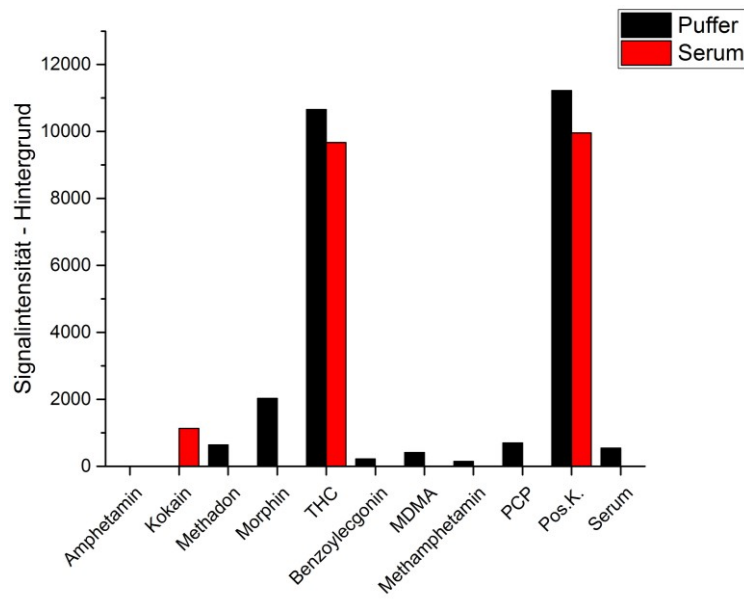


Abbildung 23: Ergebnis eines ELISAs mit dem Antikörper T2 gegen THC-BSA. Verglichen wird der Nachweis bei der Verdünnung des primären Antikörpers in Puffer (2 % BSA; schwarz) und Serum (rot). Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper wurden in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

Der ELISA von THC zeigt, dass in diesem Fall kein Einfluss von Serum zu beobachten war. Ausschlaggebend ist dabei ein gleichbleibendes bzw. nur gering verändertes Signal für das Drogen-BSA Konjugat und der Positivkontrolle. Zusätzlich sind weitere schwache Signale einiger Drogen-BSA Konjugate bei der Verwendung von Puffer bzw. des Kokain-BSA Konjugats bei der Nutzung von Serum zu erkennen. Diese wurden jedoch als Hintergrundsignale deklariert. Dieses Ergebnis führte zu einer weiteren Verwendung des anti-THC Antikörpers T2 für einen Drogennachweis. Ein anderes Beispiel ist der Antikörper P2 gegen PCP (Abbildung 24). Im ELISA wurde der Nachweis des PCP-BSA Konjugats mit einer Antikörperverdünnung in Puffer und in Serum miteinander verglichen.

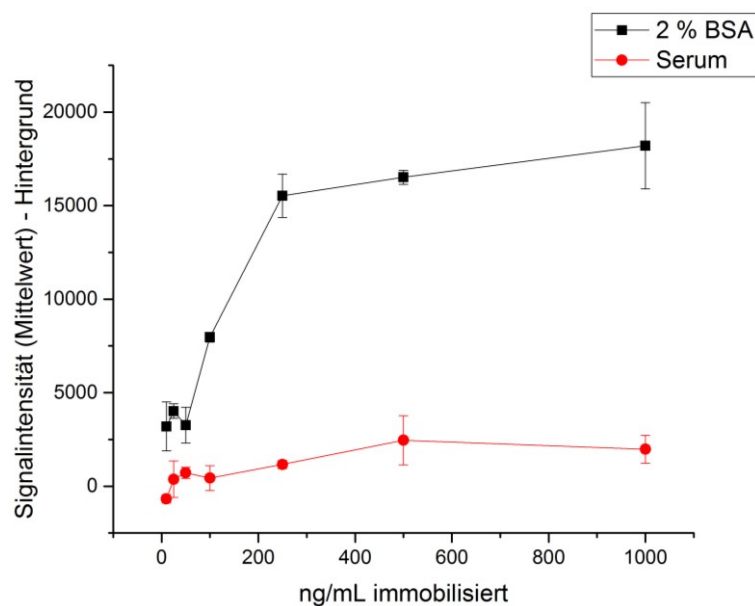


Abbildung 24: ELISA zum Nachweis von PCP-BSA. Es wurde eine Konzentrationsreihe des Konjugats immobilisiert. Nach einem Blockierschritt mit 2 % BSA wurde die Inkubation mit dem anti-PCP Antikörper P2 in 2 % BSA (schwarz) und in Serum (rot) durchgeführt (jeweils 1:1.000). Die Detektion erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, welchen Einfluss das Probenmaterial auf eine Messung haben kann. Obwohl der Antikörper P2 keine Kreuzreaktivität mit Serum im ELISA zeigte, nahmen die Signalintensitäten deutlich ab, sobald der primäre Antikörper in Serum eingesetzt wurde. Es konnten selbst hohe PCP-BSA Konzentrationen (1 $\mu\text{g/mL}$) nicht detektiert werden. Daher wurde dieser Antikörper von weiteren Versuchen ausgeschlossen, da mit diesem keine Quantifizierung im Serum möglich ist.

3.4. Etablierung des Nachweises freier Drogen über kompetitiven ELISA

Nach einer erfolgreichen Qualitätskontrolle der primären Antikörper bezüglich ihrer Spezifität in Puffer, wurde im Folgenden untersucht, ob die Antikörper, die die Qualitätskontrolle bestanden haben, auch die freie Droge in Serum erkennen. Zusätzlich zu den hochspezifischen Antikörpern wurden auch Antikörper im kompetitiven Ansatz untersucht, welche Konjugate aus der selben Substanzklasse, wie z.B. Amphetamine, detektiert hatten. Dies sollte klären, ob sich diese Antikörper bei der Zugabe freier Droge im kompetitiven ELISA genauso verhalten wie im ELISA. Es wurden Antikörper für folgende Drogen für die Etablierung des kompetitiven Ansatzes verwendet: THC, MDMA, Methadon, Benzoylcegonin, Methamphetamin, Amphetamin und Kokain.

Um die Antikörper, welche mehrere Drogen-BSA Konjugate einer Substanzklasse, wie Amphetamine, detektiert haben (Tabelle 12, gelb), genauer zu untersuchen, wurden die zuvor

detektierten Konjugate in identischen Konzentrationen immobilisiert. In der Präinkubation wurden anschließend die freien Drogen in der gleichen Konzentration, die um ein Vielfaches über dem geforderten Richtwert der GTFCh lagen, mit Serum und dem zu untersuchenden primären Antikörper inkubiert. Es wurde eine hohe kompetitive Konzentration gewählt, um eine klare Aussage über die Nachweisbarkeit der einzelnen Drogen treffen zu können. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass etwaige Kreuzreaktivitäten bzw. eine Konkurrenz unter noch nicht optimierten Versuchsbedingungen übersehen werden. Die Detektion erfolgte über einen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper.

Im Folgenden werden Beispiele von primären Antikörpern gezeigt (Abbildung 25 und Abbildung 26), bei denen Kreuzreaktivitäten innerhalb der Substanzklasse im ELISA beobachtet wurden.

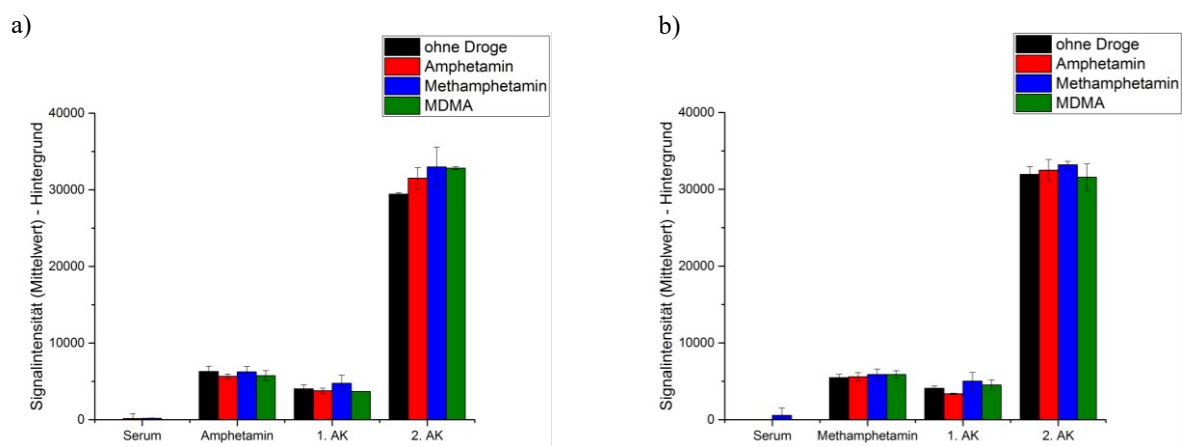


Abbildung 25: Vergleich kompetitiver ELISAs mit dem anti-Methamphetamin Antikörper Me9. Es wurden a) Amphetamin-BSA und b) Methamphetamin-BSA immobilisiert (jeweils 500 ng/mL). Als freie Drogen wurden Amphetamin, Methamphetamin und MDMA in der gleichen Konzentration von 500 ng/mL eingesetzt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Das Ergebnis des Versuchs in Abbildung 25 zeigt, dass der Antikörper Me9 für einen kompetitiven Nachweis nicht geeignet ist. Der untersuchte Antikörper Me9 erkennt Amphetamin-BSA und Methamphetamin-BSA, aber es war keine Konkurrenz durch die zugegebenen freien Drogen messbar. Dieses Verhalten zeigten auch andere Antikörper innerhalb der Substanzklasse der Amphetamine, z.B. A1 und Me1. Auf Grund der Ergebnisse wurde die genannten Antikörper verworfen, da es für die Zielsetzung essentiell ist Antikörper zu benutzen, die eine spezifische Konkurrenz durch die jeweilige freie Droge zeigen.

Ein ähnliches Phänomen wurde bei der Untersuchung von anti-Kokain Antikörpern beobachtet. Diese waren in der Lage entweder spezifisch das Kokain-BSA Konjugat oder zusätzlich das Benzoylcegonin-BSA Konjugat zu detektieren. Im folgenden Beispiel (Abbildung 26), wurde das Kokain-BSA Konjugat immobilisiert und in der Präinkubation wurde freies Kokain und

dessen Hauptabbauprodukt Benzoyllecgonin in derselben Konzentration eingesetzt. Die Detektion erfolgte dann mittels einem markierten sekundären Antikörper, der gleichzeitig als Versuchskontrolle (erfolgreiche Immobilisierung und Interaktion der Antikörper) diene.

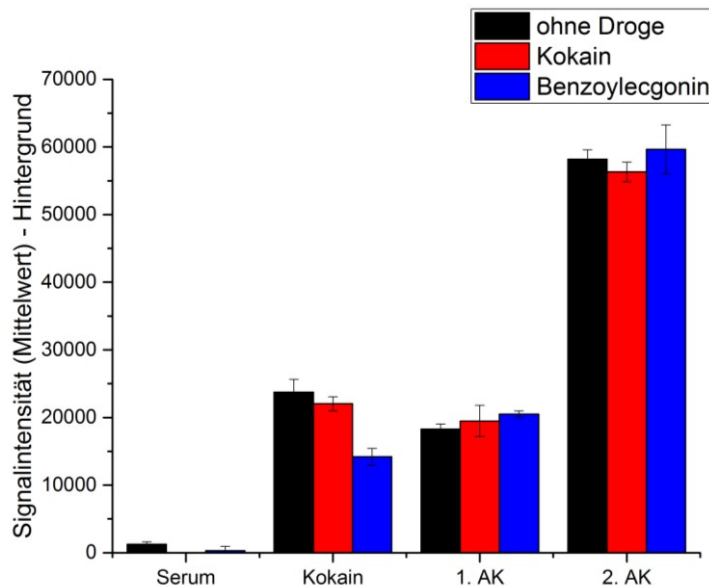


Abbildung 26: Kompetitiver Nachweis von Kokain (rot) und Benzoyllecgonin (blau). Es wurde Kokain-BSA immobilisiert (50 ng/mL) und anschließend mit dem Gemisch aus Serum, freier Droge (100 ng/mL) und dem anti-Kokain Antikörper K1 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Dieses Experiment zeigt, dass kreuzreagierende Antikörper unter Umständen weiter genutzt werden können. Der Antikörper K1 zeigte im ELISA Signale für Kokain-BSA und Benzoyllecgonin-BSA (Abbildung 22), jedoch war die Competition mit freiem Kokain in Serum nicht möglich. Andererseits konnte der kompetitive ELISA mit freiem Benzoyllecgonin im Serum erfolgreich durchgeführt werden. Dieser Effekt konnte noch bei einem weiteren anti-Kokain Antikörper (K3) beobachtet werden. Auf Grund der nicht auftretenden Competition durch freies Kokain, ist von einer spezifischen Bindung von freiem Benzoyllecgonin im Serum auszugehen. Damit sind diese Antikörper für die folgenden Versuche geeignet. Der Antikörper K1 wurde anschließend auf Grund der Sensitivität für die Etablierung des kompetitiven Nachweises von Benzoyllecgonin in weiteren Experimenten verwendet.

Im nächsten Schritt wurden die Antikörper, wie T1, MD1, K1 und Mt1, untersucht, ob und in welchen Konzentrationsbereich diese durch freie Drogen im Serum in der Bindung an das jeweilige Konjugat inhibiert werden können. Dazu wurden Konzentrationsreihen der Drogen-BSA Konjugate in einer MTP immobilisiert. Während der Präinkubation wurden Serum, der zu testende primäre Antikörper und bis zu 4 verschiedenen kompetitive Drogenkonzentrationen

eingesetzt. Die Drogenkonzentrationen richteten sich nach dem jeweiligen vorgeschriebenen Richtwert, d.h. neben einer Negativkontrolle wurden der Richtwert und je eine Zehnerpotenz unter bzw. über diesen Wert eingesetzt. Zur Detektion wurde der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper verwendet.

Im Folgenden werden die Beispiele für den anti-THC Antikörper (T1; Abbildung 27), den anti-Methadon Antikörper (Mt1), den anti-MDMA Antikörper (MD1) und den anti-Kokain Antikörper (K1) (Abbildung 28a-c) gezeigt.

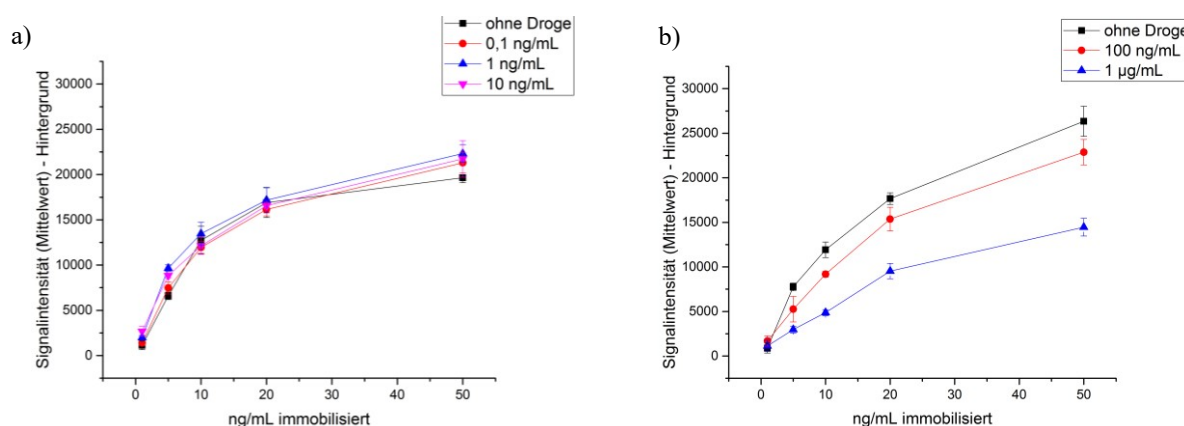


Abbildung 27: Kompetitiver Nachweis von THC. Es wurde eine Konzentrationsreihe des THC-BSA Konjugats immobilisiert und anschließend mit dem Gemisch aus Serum, freier Droge und dem anti-THC Antikörper T1 inkubiert. Für die freie Droge wurden Konzentrationen a) um den Richtwert von 1 ng/mL und b) um ein vielfaches höher als der Richtwert eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 27 zeigt einen kompetitiven ELISA um THC im Serum nachzuweisen. In der Richtlinie der GTFCh zeichnet sich THC durch den niedrigsten Richtwert von 1 ng/mL aus. In dem Experiment (Abbildung 27a) mit maximal 10 ng/mL THC konnte keine Signalabnahme bei steigenden Drogenkonzentrationen beobachtet werden. In einem weiteren Versuch wurde die Menge an freiem THC erhöht (1 µg/mL) (Abbildung 27b). Die höchste eingesetzte kompetitive Konzentration entsprach dem tausendfachen des geforderten Richtwerts. Dies bedeutet, dass die Konkurrenz mit freiem THC im Serum erfolgreich war, aber die Sensitivität noch deutlich verbessert werden muss. Dies könnte über Anpassungen der Antikörpermenge bzw. der immobilisierten THC-BSA Konzentrationen realisiert werden. Die Versuche wurden später im Rahmen der Etablierung einer Quantifizierung unternommen (siehe Abschnitt 3.5.5). Als nächstes werden kompetitive ELISAs zur Abschätzung des Konzentrationsbereiches für einen Nachweis von Methadon, MDMA und Benzoylecgonin im Serum (Abbildung 28) gezeigt. Dazu wurden als Drogenkonzentrationen neben der Negativkontrolle 3 verschiedene kompetitive Drogenkonzentrationen eingesetzt. Diese deckten 3 Zehnerpotenzen ab und

ermöglichten dadurch eine Einschätzung des nachweisbaren Konzentrationsbereiches. Dies war für die spätere Etablierung der Eichgeraden relevant, da bereits hier eine erste Beurteilung bezüglich Sensitivität und eingesetzter Immobilisierungskonzentration und Antikörpermenge vorgenommen werden konnte.

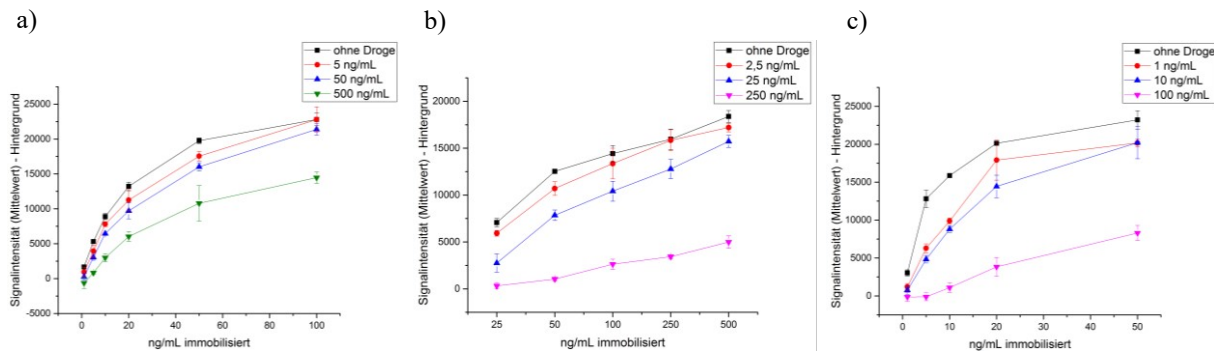


Abbildung 28: Kompetitiver Nachweis von a) Methadon (Antikörper Mt1), b) MDMA (Antikörper MD1) und c) Benzoylcegonin (Antikörper K1) in Serum. Immobilisiert wurde eine Konzentrationsreihe der Drogen-BSA Konjugate und anschließend mit dem Gemisch aus Serum, freier Droge und dem primären Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Die eingesetzten Drogenkonzentrationen decken 3 10er-Potenzen ab, um eine grobe Einschätzung des nachweisbaren Konzentrationsbereiches zu ermöglichen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 28a zeigt einen erfolgreichen kompetitiven Nachweis von Methadon in Serum mit unterschiedlichen Konzentrationen an Methadon. Alle 4 Kurven zeigten einen sigmoidalen Verlauf. Bereits geringe Mengen freier Droge (5 ng/mL) zeigten eine Abnahme in der Signalintensität. Weiterhin konnte eine klare Unterscheidung zwischen der Negativkontrolle und dem Richtwert von 50 ng/mL vorgenommen werden. Für eine spätere Etablierung einer Quantifizierung ist es wichtig zu beachten, dass auch für eine sehr hohe kompetitive Drogenkonzentration von 500 ng/mL Signale gemessen werden konnten. Dies könnte für einen quantifizierbaren Bereich in hohen kompetitiven Konzentrationen und damit für eine schwierige Differenzierung um den Richtwert von 50 ng/mL sprechen. Generell galt, dass eine sehr gute Sensitivität und ein großer nachweisbarer Konzentrationsbereich erreicht werden konnten. Die gewählten Versuchsbedingungen (Antikörpermenge und Immobilisierungskonzentration bis 100 ng/mL) dienten als Grundlage für weitere Versuche. Da jedoch in diesem Versuch noch keine Sättigung der Kurve erreicht wurde, sollten in weiteren Versuchen auch höhere Konzentrationen zur Immobilisierung genutzt werden.

Für den kompetitiven Nachweis von MDMA (Abbildung 28b) konnten Drogenkonzentration von 25 ng/mL (Richtwert) und 250 ng/mL verlässlich von der Negativkontrolle differenziert werden. Die Sensitivität war im Vergleich zu Methadon etwas geringer, aber eine Kompetition um den relevanten Bereich des Grenzwertes von 25 ng/mL war erfolgreich. Ebenso konnte ein

großer nachweisbarer Konzentrationsbereich mit den gewählten Versuchsbedingungen erzielt werden. Beim Nachweis von MDMA zeigte sich ein linearer Zusammenhang, sodass auch hier höhere Immobilisierungskonzentrationen getestet werden sollten, um einen möglichst großen linearen Bereich in der späteren Eichkurve zu erhalten.

Der Nachweis von Benzoylecgonin (Abbildung 28c) zeigte ein ähnliches Bild wie Methadon. Es war möglich sowohl geringe Drogenkonzentrationen (1 ng/mL), den Richtwert (10 ng/mL) und hohe Drogenkonzentrationen (100 ng/mL) von der Negativkontrolle zu unterscheiden. Dadurch wurde eine sehr gute Sensitivität, aber auch ein großer messbarer Konzentrationsbereich erreicht. Ebenfalls erreichte der Kurvenverlauf nicht die Sättigung, sodass auch für den Nachweis von Benzoylecgonin höhere Konzentrationen des Drogen-BSA Konjugats überprüft werden sollten. Da für diese Droge ein Grenzwert von 30 ng/mL gilt, sollten die gewählten kompetitiven Drogenkonzentrationen einen Bereich bis mindestens 300 ng/mL abdecken. Für Benzoylecgonin ist zu beachten, dass ein anti-Kokain Antikörper (K1) verwendet wurde, welcher spezifisch das Hauptabbauprodukt von Kokain erkennt. Dies konnte in vorangegangenen Versuchen (Abbildung 26) gezeigt werden.

Die kompetitiven Nachweise von Methadon, Benzoylecgonin und MDMA konnten erfolgreich reproduziert werden und durch die erreichte Sensitivität wurde die Grundlage geschaffen einen quantifizierbaren Nachweis für diese Drogen zu etablieren. Damit reduziert sich die Anzahl der nachweisbaren Drogen in Serum von 7 auf 3.

3.5. Etablierung einer Quantifizierung von Drogen in Serum

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse, die zur Etablierung von Eichgeraden führten, gezeigt. Zunächst werden einige Versuchsbedingungen, wie Blockier- und Verdünnungsschritte und die Lagerstabilität getestet. Damit sollen belastbare Ergebnisse gewährleistet werden. Dafür wurden die Antikörper verwendet, mit denen im Abschnitt 3.4 ein kompetitiver Nachweis etabliert werden konnte. Diese Antikörper sind MD1 gegen MDMA, Mt1 gegen Methadon, T1 gegen THC und K1 gegen Benzoylecgonin. Die eingesetzten kompetitiven Drogenkonzentrationen orientierten sich an den Richtwerten für die jeweilige Droge. Ziel war es, einen großen Konzentrationsbereich nachzuweisen, welcher eine Quantifizierung authentischer Proben in einem zu erwartenden Rahmen ermöglicht [49]. Dazu wurden neben dem Nullwert 1 – 2 Konzentrationen unterhalb des Richtwertes, der Richtwert und Konzentrationen in regelmäßigen Abständen bis zu einem Vielfachen über dem vorgeschriebenen Wert eingesetzt. Für die Eichkurve im MTP-Format und 10 Datenpunkten ergab sich z.B. für MDMA (analytischer Grenzwert = 25 ng/mL) Konzentrationen von

2,5 ng/mL bis zu 250 ng/mL. Um diese Bandbreite abdecken zu können, wurden unterschiedliche Immobilisierungskonzentrationen der Drogen-BSA Konjugate und Antikörperverdünnungen getestet. Die Reproduzierbarkeit wurde durch mehrfache Wiederholungen getestet. Weiterhin sollte sichergestellt werden, dass das Ergebnis unabhängig von dem Vorhandensein mehrerer Drogen im Serum oder mehrerer Drogen-spezifischer Antikörper ist. Dies diente darüber hinaus dazu, festzustellen, ob ein paralleler Nachweis verschiedener Drogen möglich ist. Zur Verifizierung des Versuchsaufbaus wurden im Labor hergestellte Blindproben und vom Landeskriminalamt Berlin bereitgestellte Serumproben vermessen. Die vom LKA Berlin bezogenen Proben wurden dort mit massenspektrometrischen Verfahren quantifiziert. Mit diesen Daten konnten die Ergebnisse der kompetitiven ELISAs verglichen werden.

3.5.1. Einfluss der Vorbereitung des Referenzmaterials

Ein weiterer Aspekt war die Vorbereitung des Serums und des Referenzmaterials. Die reinen Drogen wurden gelöst in analytischem Methanol geliefert. Bei hohen kompetitiven Drogenkonzentrationen ist dementsprechend der Methanolanteil in der Serumprobe zur Erstellung der Eichgeraden relativ hoch (bis zu 50 % (v/v) Methanol). Deswegen wurde ein ELISA für Methadon-BSA mit verschiedenen Mengen an Methanol durchgeführt (Abbildung 29). Dazu wurde das Konjugat immobilisiert und anschließend mit einer Lösung bestehend aus Serum, anti-Methadon Antikörper und steigenden Konzentrationen an Methanol inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper.

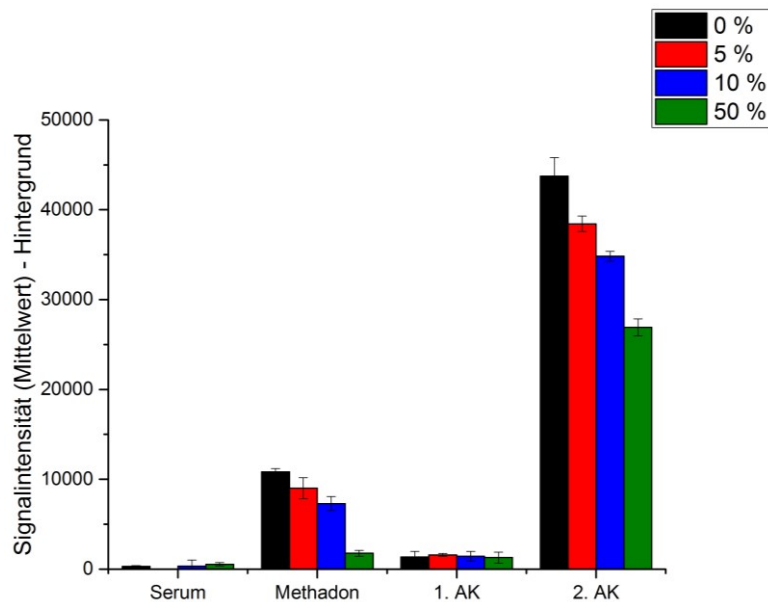


Abbildung 29: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis von Methadon-BSA unter dem Einfluss von steigenden Methanoldmengen. Es wurden 100 ng/mL des Konjugats immobilisiert. Die Methanoldmengen entsprechen dem finalen Anteil an der Lösung aus Serum und primären Antikörper. Die Detektion erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

In der Abbildung 29 ist dargestellt, dass bereits geringe Mengen Methanol einen Einfluss auf das Messergebnis haben können. Bereits ab einem 5 %-igen Anteil Methanol am Probenvolumen war eine Signalabnahme zu beobachten. Im Umkehrschluss hat dieses Ergebnis auch eine große Bedeutung für den kompetitiven ELISA und die Zuverlässigkeit der Eichkurve, da bereits ab geringeren kompetitiven Drogenmengen keine Signale mehr messbar wären. Dies würde zu einer Verringerung des Nachweisbereiches bzw. zu einer Verfälschung der Eichkurve und des quantifizierbaren Bereichs führen. Infolge dessen wurde durch Ansetzen von Vorverdünnungen des Referenzmaterials in Serum oder A. bidest der Methanolanteil in der Probe gering gehalten.

Für eine weitere Optimierung des Protokolls wurde darauf geachtet, die Verdünnung des Referenzmaterials in einem Gefäß vorzunehmen. Bei der Erstellung der Eichkurve wurden Abweichungen innerhalb des Verlaufs beobachtet. Dieser Effekt trat auf, sobald verschiedene Vorverdünnungen der reinen Droge in mehreren Reaktionsgefäßen (Verdünnungsstufen) hergestellt wurden. In Abbildung 30 wird dieser Verdünnungseffekt illustriert und mit der Herstellung in nur einem Reaktionsgefäß verglichen.

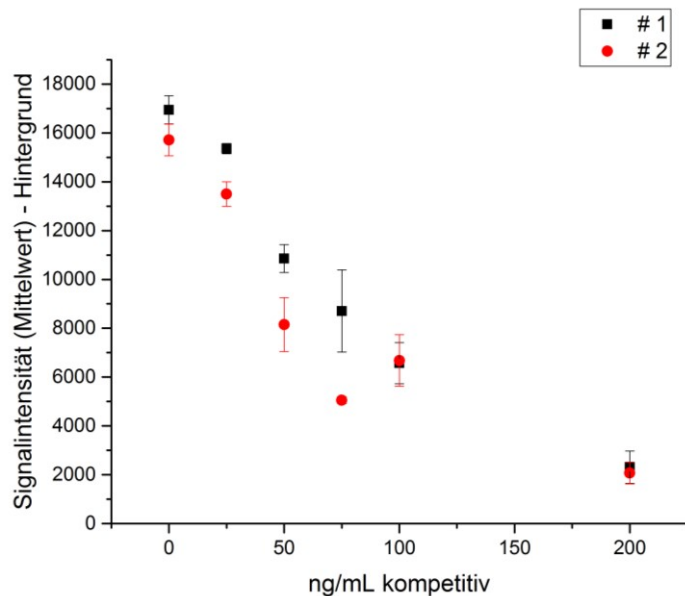


Abbildung 30: Gegenüberstellung eines Ergebnisses für die Eichkurve von Methadon-BSA. Die Vorverdünnung des Referenzmaterials wurde in einem (schwarz) bzw. in 2 Gefäßen (rot) vorgenommen. Vom Methadon-BSA Konjugat wurde 1 µg/mL immobilisiert. Die Vorverdünnungen der reinen Drogen dienten dem Ansetzen des gespikten Serums. Die Detektion erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Anhand dieses Resultats zeigt sich die Relevanz bei einer Vorverdünnung mit möglichst wenigen Zwischenschritten zu arbeiten. Wenn ein zusätzlicher Verdünnungsschritt eingebaut wird (rot), ist zwischen den kompetitiven Konzentrationen 75 ng/mL und 100 ng/mL eine deutliche Verschiebung innerhalb der Eichkurve zu erkennen. Dies deckt sich mit dem Pipettierschema, da zwischen diesen beiden Mengen ein Reaktionsgefäß gewechselt wurde. Daraufhin wurde das Protokoll angepasst, indem die Vorbereitungen des Referenzmaterials in einem Reaktionsgefäß vorgenommen wurden.

3.5.2. Überprüfung des Blockierschritts und der Antikörperinkubation

Neben dem Einfluss des Probenmaterials wurden im Zuge der Assayentwicklung weitere Parameter wie unterschiedliche Blockierlösungen und die Antikörperinkubation untersucht. Da mit einem komplexen Probenmaterial gearbeitet wurde, sollte untersucht werden ob eine Absättigung freier Bindestellen notwendig ist. Dazu wurde am Beispiel von Amphetamin ein ELISA durchgeführt (Abbildung 31). Der primäre Antikörper wurde in 2 % BSA und in Serum verdünnt. Bei diesen beiden Ansätzen wurde auf ein Blockierschritt verzichtet. Als direkter Vergleich wurde der Nachweis nach einem Blockierschritt und der Antikörperinkubation mit 2 % BSA mitgeführt.

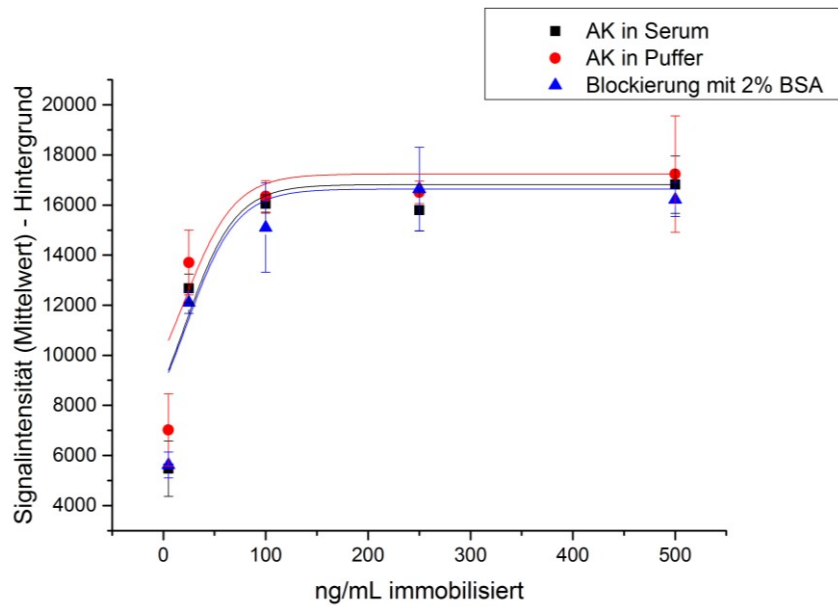


Abbildung 31: ELISA zum Nachweis von Amphetamin-BSA. Das Konjugat wurde in einer Konzentrationsreihe immobilisiert. Der primäre Antikörper A2 wurde in Serum (schwarz) und in 2 % BSA (rot) ohne einen Blockierschritt eingesetzt. Ebenfalls in 2 % BSA angesetzt, wurde der Antikörper nach dem Blocken mit 2 % BSA auf der Platte inkubiert (blau). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Aus Abbildung 31 ist ersichtlich, dass die Messungen die gleichen Ergebnisse liefern. Es war kein bzw. ein sehr geringer Unterschied in den Signalintensitäten bei den verschiedenen Verdünnungslösungen zu erkennen. Die Durchführung einer gesonderten Blockierung zeigte ebenfalls nur eine geringe Abweichung in den absoluten Signalintensitäten. Anhand dieser Ergebnisse wurde in den weiteren Experimenten auf einen Blockierschritt verzichtet, was zu einer Zeitersparnis führte. Die Zeitersparnis ist in Hinblick auf eine mögliche Miniaturisierung und Automatisierung wichtig.

Weiterhin wurde getestet, ob die Inkubationsschritte der primären und sekundären Antikörper kombiniert werden können, um die Versuchszeit weiter zu verkürzen. Dabei wurde in der Präinkubation von der freien Droge und dem primären Antikörper bereits der sekundäre Antikörper zum Gemisch gegeben. Als Vergleich dient die Inkubation des sekundären Antikörpers in einem gesonderten Schritt, nachdem die freie Droge und der primäre Antikörper bereits in der MTP inkubiert und ein Waschschrift durchgeführt wurde. Am Beispiel von Methadon-BSA wurde die Inkubation in einem kompetitiven ELISA des primären Antikörpers mit der freien Droge und des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers einzeln und kombiniert (Abbildung 32) durchgeführt.

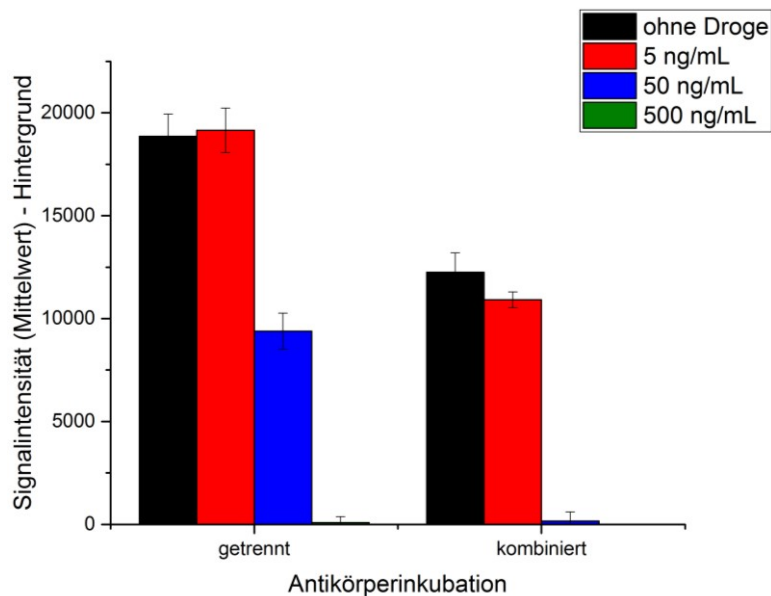


Abbildung 32: Kompetitiver ELISA zum Nachweis von Methadon-BSA mit getrennter und kombinierter Antikörperinkubation. Vom Drogen-BSA Konjugat wurden 100 ng/mL immobilisiert. Von der freien Droge wurden 3 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Verglichen wurde das Ergebnis wenn das Gemisch aus Serum, freier Droge und primären Antikörper vor der Detektion mit dem sekundären Antikörper bzw. zeitgleich in der MTP inkubiert wurde. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Anhand des Experiments wird der Einfluss einer simultan durchgeführten Antikörperinkubation während der Präinkubation deutlich. Gleiche kompetitive Drogenmengen werden unterschiedlich detektiert. Zusätzlich ist eine Abnahme der absoluten Signalintensitäten bei der kombinierten Inkubation aus primären und sekundären Antikörper und der freien Droge zu beobachten. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Inkubation des sekundären Antikörpers weiterhin getrennt von der Präinkubation durchgeführt, um vor allem eine gute Sensitivität zu gewährleisten.

3.5.3. Batch-to-Batch Variationen

Es wurde versucht sämtliche Konjugate und Antikörper aus einem Batch zu beziehen, um Unterschiede z.B. in der Kopplungsrate zu vermeiden. Wenn dies nicht möglich war, wurde überprüft, ob unterschiedliche Batches/Chargen zu den selben Ergebnissen führen. Als Beispiel ist der Nachweis des MDMA-BSA Konjugats gezeigt (Abbildung 33).

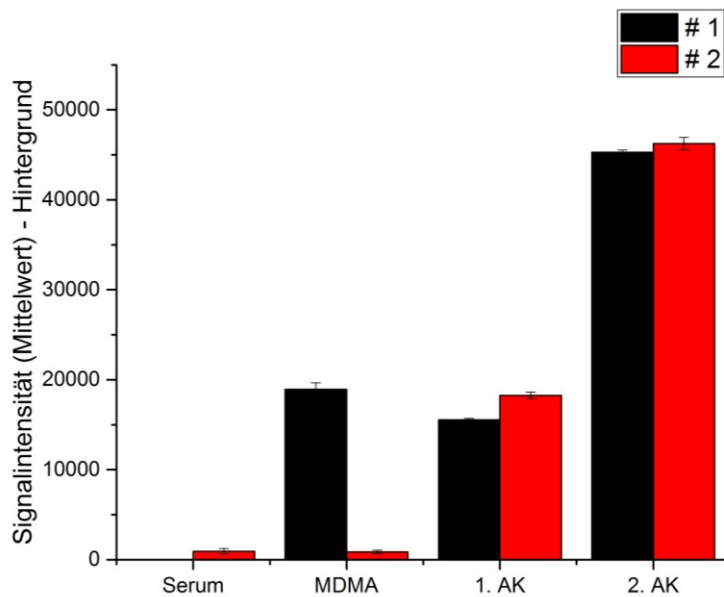


Abbildung 33: Vergleich eines Nachweises von MDMA-BSA zwischen Batch 1 (schwarz) und Batch 2 (rot). Vom Konjugat wurden 500 ng/mL immobilisiert. Der Nachweis erfolgte mittels dem anti-MDMA Antikörper MD1 (1:2.000) mit anschließender Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Zusätzlich wurde als Negativkontrolle Serum und als Positivkontrollen die beiden verwendeten Antikörper mitgeführt. Von den gemittelten Triplikaten wurde der Karbonatpuffer als Hintergrund abgezogen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Anhand der Abbildung 33 ist ersichtlich, dass zwischen unterschiedlichen Chargen des BSA-Konjugats deutliche Unterschiede auftreten können. Die Charge 1 wurde von dem anti-MDMA Antikörper MD1 erkannt und konnte für weitere Versuche verwendet werden. Hingegen wurde die Charge 2 nicht von dem primären Antikörper erkannt. Basierend auf diesem Ergebnis wurde bei jedem Chargenwechsel Kontrollexperimente im ELISA Format zur Überprüfung der Funktionalität durchgeführt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Variation der biologischen Probe. Wie bereits zuvor gezeigt (Abbildung 24), kann Serum einen gravierenden Einfluss auf die Spezifität der Antikörper haben. Zusätzlich kann das biologische Material an sich Schwankungen unterliegen. Um das zu überprüfen, wurden 2 unterschiedliche Seren zweier Hersteller genutzt um eine Antikörperverschüttung herzustellen und damit Methadon-BSA nachzuweisen (Abbildung 34). Als Kontrolle diente eine Verdünnung, welche mit PBS-T angesetzt wurde.

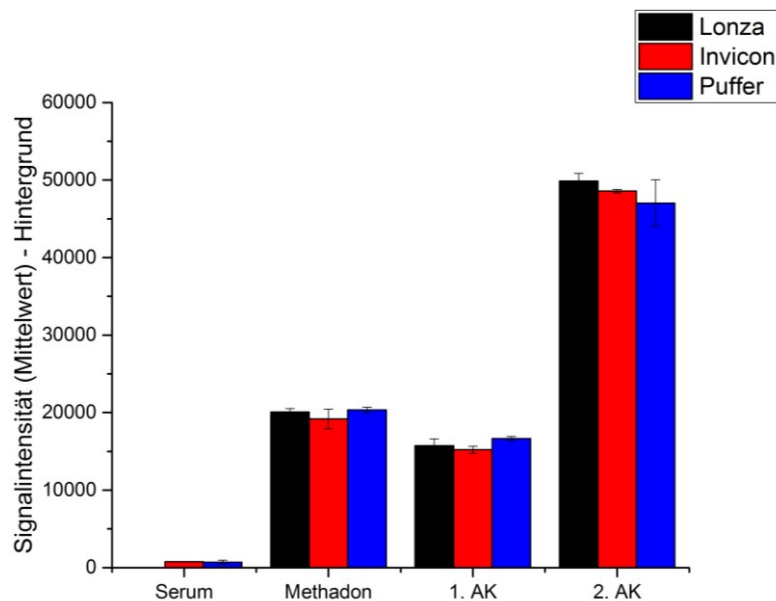


Abbildung 34: Vergleich eines Nachweises von Methadon-BSA mit Seren der Hersteller Lonza (schwarz) und Invicon (rot). Zusätzlich als Kontrolle wurde PBS-T (blau) genutzt. Vom Konjugat wurden 100 ng/mL immobilisiert. Der Nachweis erfolgte mittels dem anti-Methadon Antikörper Mt1 (1:1.000) mit anschließender Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Zusätzlich wurde als Negativkontrolle Serum und als Positivkontrollen die beiden verwendeten Antikörper mitgeführt. Von den gemittelten Triplikaten wurde der Karbonatpuffer als Hintergrund abgezogen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Das Ergebnis des ELISAs zeigt, dass, sofern ein Antikörper keine Kreuzreaktivitäten mit Serum aufweist, Variationen des biologischen Mediums keinen Effekt auf das Messergebnis haben. Die Signale des Methadon-BSA Konjugats und der Kontrollen weisen nur sehr geringe Unterschiede auf. Basierend auf diesem Resultat wurde bei neuen Chargen keine gesonderten Kontrollversuche durchgeführt.

3.5.4. Stabilität der Serumproben und beschichteter 96-well MTP

Im Folgenden Abschnitt wurden 2 Faktoren untersucht, die in Hinblick auf die Analyse realer Proben wichtig sind: I) wie stabil bei – 20 °C gelagerte gespikte Serumproben sind und II) ob eine beschichtete 96-well MTP auch noch nach mehreren Wochen vergleichbare Ergebnisse liefert. Diese Versuche sollten zeigen, ob eine Quantifizierung von gefrorenen und über längere Zeit gelagerten Serumproben vergleichbare Ergebnisse liefern wie nicht gelagerte Proben. Die Lagerfähigkeit einer beschichteten MTP ist vor allem für eine mögliche Reduzierung technischer Fehler und für eine Zeitersparnis in der Versuchsdurchführung von Belangen.

Zunächst wurde die Lagerfähigkeit von gespikten Serumproben überprüft. Dazu wurde unverdünntes Serum mit einer definierten Menge freier Droge (80 ng/mL Methadon), versetzt, aliquotiert (4 Aliquots a 0,6 mL) und anschließend bei – 20 °C eingefroren. In einem 7 Tage-Rhythmus wurde je eine Probe aufgetaut und im kompetitiven ELISA mit einer Eichgerade in

Triplikaten analysiert. Dieser Versuch lief über einen Zeitraum von vier Wochen, so dass 4 Proben vermessen wurden. Die Abbildung 35 zeigt das Ergebnis dieses Lagerversuchs.

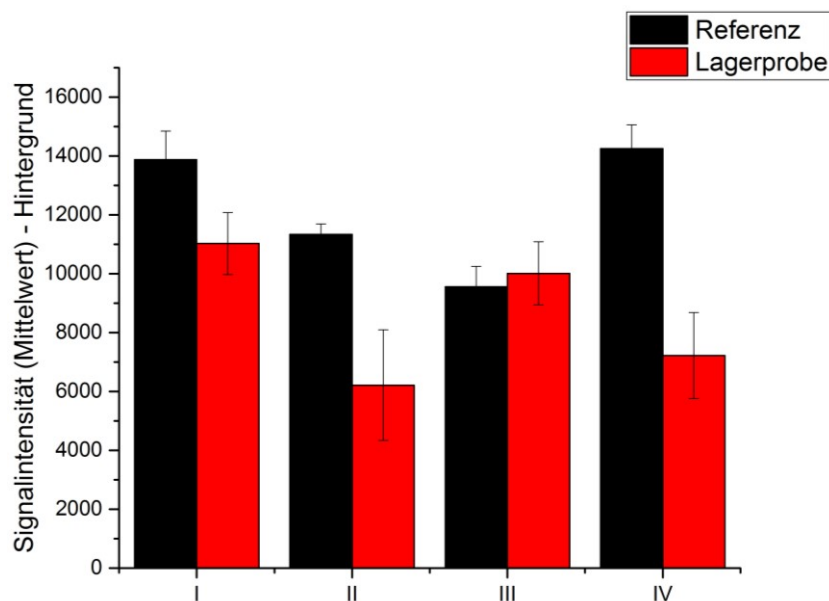


Abbildung 35: Zusammenfassung der Analyse von gelagerten Methadonproben. Von dem Methadon-BSA Konjugat wurde 500 ng/mL immobilisiert. Die Referenz (schwarz) entspricht einer Drogenkonzentration von 50 ng/mL. Die Lagerprobe (rot) wurde wie zuvor beschrieben behandelt. Je Probe wurde in Triplikaten gemessen und anschließend der Mittelwert der Signalintensitäten gebildet. Verglichen werden hier die Signalintensitäten zweier Proben über einen Zeitraum von 4 Wochen (I – IV). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Zusammenfassung zeigt, dass eine positive Serumprobe lagerfähig ist. Mit Ausnahme der dritten Probe zeigte die Lagerprobe geringere Signalintensitäten als die Referenzprobe. Dies stellt tendenziell die Verhältnisse richtig dar, da in der Referenzprobe eine geringere Drogenkonzentration vorlag. Es ist zu beachten, dass sowohl die Eichgerade, als auch die Immobilisierung des Konjugats erst am jeweiligen Versuchstag durchgeführt wurde, was zu Abweichungen in den errechneten Konzentrationen der Lagerproben führen kann. Des Weiteren wiesen die Eichgeraden untereinander Varianzen auf, sodass hier technische Abweichungen als Ursache vermutet wurden. Daher wurde der Referenzwert von 50 ng/mL herangezogen (schwarz). Damit sollte eine Beurteilung möglicher Lagereffekte anhand der Signalintensitäten ermöglicht werden. Die mittels individueller Eichgeraden berechneten Konzentrationen für die Lagerprobe sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Berechnete Konzentrationen der Lagerproben von Methadon über einen Zeitraum von 4 Wochen.

Woche	Berechnete Konzentrationen [ng/mL]
1	60,11
2	79,16
3	48,13
4	80,23

Ein Trend, dass sich die Probe beim Lagern verändert und über den Zeitraum eine gleichbleibende zu- oder abnehmende Tendenz zu detektieren war, wurde nicht beobachtet. Allgemein wurde angenommen, dass die Proben während ihrer Lagerung stabil waren und die Abweichungen in den Berechnungen auf technische Varianzen in der Erstellung der Eichgeraden zurückzuführen sind. Durch Verbesserung der Versuchsdurchführung, z.B. Automatisierung der Waschritte oder Reduzierung der Zwischenschritte, sollte verlässlichere Ergebnisse ermöglicht werden, was durch den später durchgeführten Versuch (Abbildung 36) belegt wurde.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Lagerfähigkeit einer beschichteten 96-well MTP. Die Beschichtung benötigt inklusive der Vorbereitung ca. 2,5 Stunden. Könnte diese Zeit eingespart werden, könnten mehrere MTP parallel hergestellt werden und damit technische Fehler reduziert werden. Ferner wäre dies ein Vorteil für einen diagnostischen Test. Für diesen Versuch wurde Methadon-BSA und die Kontrollen nach dem etablierten Protokoll (siehe Abschnitt 2.7.3.2) in einer 96-well MTP inkubiert. Nach 2 Stunden Inkubation wurde mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Platten ohne Flüssigkeit vakuumverpackt und bis zur Versuchsdurchführung bei 4 °C gelagert. Insgesamt wurden 5 Platten vorbereitet. Eine MTP diente als Kontrolle und wurde direkt im kompetitiven ELISA vermessen. Danach wurde je eine weitere Platte pro Woche analysiert, sodass der Versuch über 4 Wochen durchgeführt wurde. Die Abbildung 36 zeigt die Zusammenfassung des Versuchs anhand der Eichgeraden für Methadon.

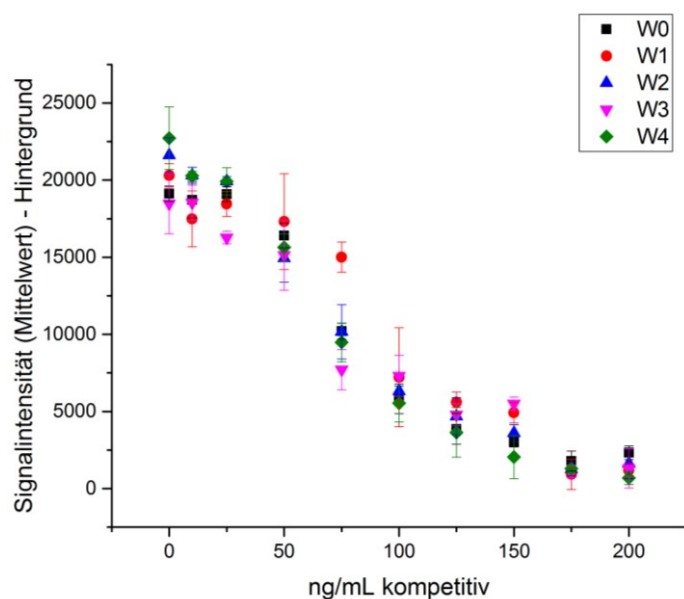


Abbildung 36: Zusammenfassung der Analyse von gelagerten und beschichteten MTPs. Von dem Methadon-BSA Konjugat wurde 1 $\mu\text{g/mL}$ immobilisiert. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus Triplikaten subtrahiert mit dem Mittelwert des Hintergrunds (Karbonatpuffer). Der Nachweis erfolgte mit dem primären anti-Methadon Antikörper Mt1 (1:500) mit anschließender Detektion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (1:1.000). W0 (schwarz) entspricht der Kontrolle und W1 bis W4 sind die Ergebnisse der jeweiligen Messungen nach der genannten Wochenanzahl. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Dieses Experiment zeigt, dass vorbereitete 96-well MTP über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen die gleichen Ergebnisse liefern. Es waren nur einzelne Ausreißer zu erkennen. Der CV zwischen den einzelnen Messwerten lag zwischen 4 % - 14 %. Der übereinstimmende Kurvenverlauf und der CV bestätigen die Lagerfähigkeit beschichteter Platten. Anhand dieser Ergebnisse könnten also in Zukunft Platten nach etablierten Protokoll vorbereitet werden.

Die gezeigten Optimierungen und Überprüfungen dienten der Verbesserung der Reproduzierbarkeit und der Gewährleistung einer guten Sensitivität. Mit diesen Anpassungen des Versuchsprotokolls wurde als nächstes an der Etablierung einer Eichgrade gearbeitet. Diese wird für eine Quantifizierung von Drogen-positiven Serumproben benötigt.

3.5.5. Etablierung einer Eichkurve (mit Reproduzierbarkeit)

Zur Etablierung einer Eichkurve wurden die eingesetzten Mengen der Konjugate zur Immobilisierung und der Antikörper variiert. Die Konzentrationsbereiche in dem die freien Drogen eingesetzt wurden, waren durch die Richtwerte der GTFCh festgelegt: THC = 1 ng/mL; Methadon = 50 ng/mL; MDMA = 25 ng/mL; Benzoylcegonin = 30 ng/mL.

Ein Antikörper mit dem ein kompetitiver ELISA etabliert werden konnte, war der anti-THC Antikörper T1. Zur Etablierung wurde maximal 50 ng/mL des THC-BSA Konjugats immobilisiert und der Antikörper T1 in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt (Abbildung 27).

Die geringste nachweisbare Drogenkonzentration war hier 100 ng/mL. Es wurden mehrere Versuchsbedingungen variiert, um eine bessere Sensitivität zu erreichen. Dazu gehörten die eingesetzten Konzentrationen des THC-BSA Konjugats und die eingesetzten Antikörpermengen. Ziel war es dabei das Verhältnis zwischen Drogen-BSA Konjugat, freier Droge und primären Antikörper so zu gestalten, dass ein sensitiver Nachweis von THC im Serum ermöglicht wurde. Verwendete Immobilisierungskonzentrationen waren 50 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL und 1 µg/mL. Die besten Ergebnisse konnten mit 100 ng/mL freier Droge erzielt werden. Darauf aufbauend wurden 100 ng/mL THC-BSA immobilisiert und in einzelnen Versuchen Verdünnungen des primären und sekundären Antikörpers in einem Bereich von 1:250 bis 1:100.000 getestet. Zunächst wurde die Verdünnung des Antikörpers T1 auf 1:20.000 festgelegt und anschließend erfolgte der Einsatz des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers in einer 1:250 Verdünnung.

Durch diese Versuche und der damit verbundenen Variationen der verwendeten Antikörper- und Konjugatmengen konnte folgendes Ergebnis erzielt (Abbildung 37) werden.

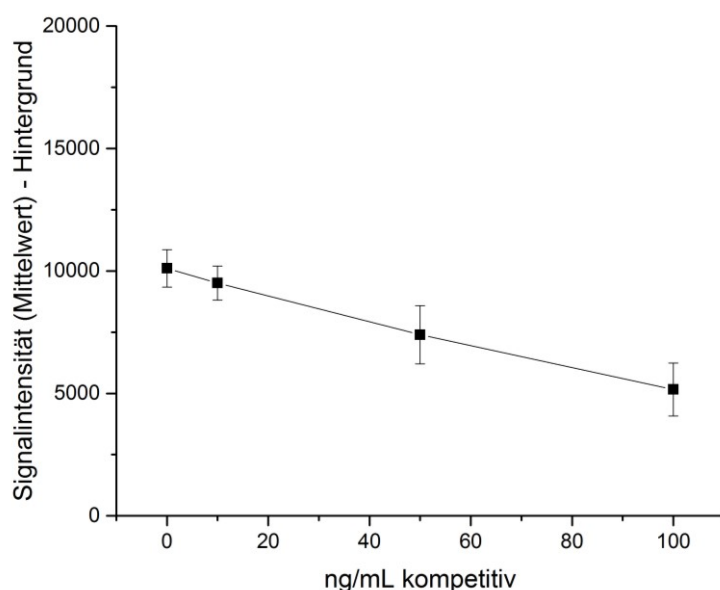


Abbildung 37: Kompetitiver Nachweis von THC nach verschiedenen Anpassungen. Es wurde 100 ng/mL des THC-BSA Konjugats immobilisiert. Der primäre Antikörper (T1) wurde 1:20.000 und der sekundäre Antikörper 1:250 eingesetzt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 37 zeigt das Ergebnis des optimierten kompetitiven ELISAs für THC. Die geringste kompetitive Drogen-Konzentration die hier eingesetzt wurde, war 10 ng/mL. Durch eine Erhöhung der Immobilisierungskonzentration und der eingesetzten Menge des sekundären Antikörpers und einer stärkeren Verdünnung des primären Antikörpers konnte eine Verbesserung der Sensitivität (Abbildung 27) erreicht werden. Da sich dieses Ergebnis nicht

reproduzieren ließ, die Konzentration an THC mit 10 ng/mL um einen Faktor 10 über den Grenzwert liegt und der Verbrauch des sekundären Antikörpers auf Grund der geringen Verdünnung sehr hoch war, wurde der Nachweis von THC im kompetitiven ELISA nicht weiterverfolgt.

Für die Nachweise von Methadon (Abbildung 38a), MDMA (Abbildung 38b) und Benzoylecgonin (Abbildung 38c) konnten hingegen reproduzierbare Eichkurven mit ausreichender Sensitivität durchgeführt werden. Hauptaugenmerk wurde hier auf den linearen Bereich gelegt, welcher für die spätere Quantifizierung maßgebend ist. Der lineare Bereich wurde anhand des Kurvenverlaufs, der LOD und LOQ und in der späteren statistischen Analyse mittels einem linearen Fit mit entsprechend hoher Korrelation ($\geq 0,9$) definiert. Vom Methadon-BSA wurde 1 $\mu\text{g/mL}$, vom MDMA-BSA 500 ng/mL und vom Benzoylecgonin-BSA 600 ng/mL immobilisiert. Anschließend wurde eine Inkubation mit einem Gemisch aus Serum, dem jeweiligen primären Antikörper und einer steigenden Menge an reiner Droge vorgenommen. Es wurden 10 verschiedenen kompetitive Drogenkonzentration in Triplikaten eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Es wurden für jede Eichkurve 5 (Benzoylecgonin) bis 10 (Methadon) Wiederholungen durchgeführt, um für die Berechnung der Koeffizienten eine ausreichend große Anzahl an Wiederholungen zu erhalten. Auf Grund der Übersichtlichkeit werden vier Wiederholungen (I-IV) gezeigt.

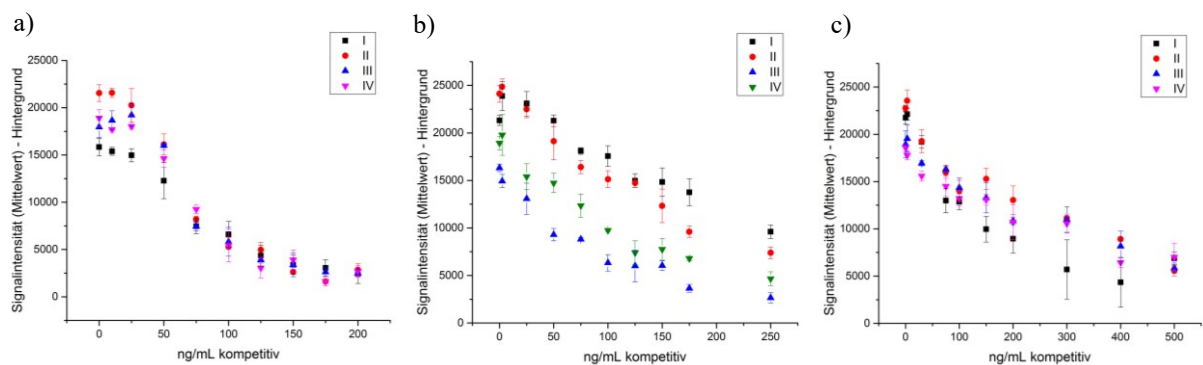


Abbildung 38: Ergebnisse der Eichkurven für a) Methadon (Antikörper Mt1 (1:500)), b) MDMA (Antikörper MD1 (1:2.000)) und c) Benzoylecgonin (Antikörper K1 (1:1.000)). Es werden 4 Wiederholungen (I – IV) gezeigt. Vom Methadon-BSA Konjugat wurde 1 $\mu\text{g/mL}$, vom MDMA-BSA Konjugat 500 ng/mL und vom Benzoylecgonin-BSA Konjugat 600 ng/mL immobilisiert. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus Triplikaten subtrahiert mit dem Mittelwert des Hintergrunds (Karbonatpuffer). Der Nachweis erfolgte mit dem primären Antikörpern mit anschließender Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 38a zeigt die sigmoidale Eichkurve von Methadon. Diese ist durch zwei Plateaus mit dazwischenliegenden linearen Bereich gekennzeichnet. Das bedeutet, dass sehr

niedrige bzw. sehr hohe Drogenkonzentrationen nicht unterschieden werden können. Der quantifizierbare bzw. lineare Bereich beginnt ab etwa 25 ng/mL und endet bei 125 ng/mL. Die Nachweisgrenze (LOD), definiert durch ein Signal-Rauschen-Verhältnis (SNR) von 3, liegt bei 150 ng/mL. Dieser Wert bezeichnet grundsätzlich die erste Konzentration die über dem Hintergrund liegt. Auf Grund des kompetitiven Ansatzes ist dieser Wert die höchste messbare kompetitive Drogenkonzentration. Die Bestimmungsgrenze (LOQ), welche den unteren Wert markiert bzw. die Konzentration die verlässlich von dem Nullwert unterschieden werden kann, lag bei 10 ng/mL. Die Reproduzierbarkeit ist für den linearen Bereich sehr gut. Im niedrigeren Konzentrationsbereich waren Signalunterschiede zwischen den Wiederholungen zu beobachten. Jedoch war das Kurvenverhalten mit einer beginnenden Plateauphase immer identisch. Der Variationskoeffizient (CV), welcher ein Maß für die Reproduzierbarkeit ist, lag für die gesamte Eichkurve von Methadon zwischen 4 % - 13 % und liegen damit unter den von der GTFCh geforderten Werten (15 % - 20 %). Für die Pearson R (Korrelationskoeffizient) für die Wiederholungen untereinander konnte ein Wert von 0,99 erreicht werden.

Ein anderer Kurvenverlauf zeigte sich am Beispiel von MDMA (Abbildung 38b). Der Nachweis von MDMA zeigte über den gesamten Verlauf einen linearen Zusammenhang. Dementsprechend groß ist auch hier der quantifizierbare Bereich von 0 ng/mL bis 250 ng/mL. Die LOD lag für den Nachweis von MDMA bei 250 ng/mL und die LOQ ebenfalls bei 10 ng/mL. Da Konzentrationen bis um ein 10-faches über den Grenzwert nachgewiesen werden können, werden die Vorgaben der GTFCh erfüllt. Damit ist die Erweiterung der Eichkurve um höhere Konzentrationen nicht notwendig. Bezüglich der Reproduzierbarkeit gab es im Vergleich zu Methadon und Benzoylcegonin größere Abweichungen. Es wurde beobachtet, dass die absoluten Signalintensitäten zwischen den einzelnen Bestimmungen voneinander abweichen und die Eichgeraden parallel zueinander verlaufen. Dies bedeutet, dass die Gleichungen, welche zur Konzentrationsbestimmung unbekannter Serumproben genutzt werden, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen würden. Dies hat zur Folge, dass für jede Quantifizierung eine gesonderte Eichgeraden mitzuführen ist. Zusätzlich erhöht eine individuelle Eichkurve pro Quantifizierung die Zuverlässigkeit. Bedingt durch die hohe Anzahl an Wiederholungen wurden CVs von 2 % - 12 % erreicht, welche zum Teil deutlich unter den geforderten Werten liegen. Der Korrelationskoeffizient für die Eichkurve von MDMA lag zwischen 0,91 – 0,97.

Die Eichkurve für Benzoylcegonin (Abbildung 38c) beginnt mit einem linearen Bereich, welcher ab einer kompetitiven Drogenkonzentration von 300 ng/mL in ein Plateau übergeht. Dies bedeutet, dass ein großer quantifizierbarer Bereich von 0 ng/mL bis mindestens

200 ng/mL vorliegt. Für die Eichgerade von Benzoyllecgonin wurde eine LOD von 500 ng/mL und eine LOQ von 10 ng/mL erreicht. Wie bereits bei Methadon zu beobachten war (Abbildung 38a), gibt es im Plateaubereich zwischen den einzelnen Messungen größere Abweichungen. Der lineare Bereich ist allerdings durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit charakterisiert. Für die Eichkurve von Benzoyllecgonin konnten CVs zwischen 3 % - 15 % erreicht werden. Auch hier entsprechen die Werte den Richtlinien. Für die Wiederholungen lag der Pearson R zwischen 0,92 – 0,98. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Produktion des anti-Kokain Antikörpers K1, welcher zum Nachweis von Benzoyllecgonin genutzt wurde, im Verlauf der Arbeit eingestellt wurde. Dies hatte zur Folge, dass einige Experimente bzw. Wiederholungen nicht mehr durchgeführt werden konnten.

Nach der Etablierung der Eichkurven für MDMA, Methadon und Benzoyllecgonin, welche durch sehr gute Sensitivitäten gekennzeichnet sind, und der Überprüfung der Reproduzierbarkeit, wurde getestet, ob die Anwesenheit mehrerer Drogen bzw. Drogen-spezifischer Antikörper Einfluss auf die Eichkurve haben kann. Diese Versuche dienten der Überprüfung ob sich die verwendeten primären Antikörper auch zur Verwendung in einem Multiplex-Verfahren eignen. Für eine Anwendung im Multiplex-Verfahren dürfen keinerlei Einflüsse sichtbar sein.

3.5.6. Einfluss von Drogengemischen und Antikörpergemischen auf die Reproduzierbarkeit der Eichgeraden

Die unter 3.5.5 etablierten Eichkurven wurden im Folgenden bezüglich ihrer Stabilität unter der Zugabe mehrerer Drogen bzw. Drogen-spezifischer Antikörper getestet. Dies sollte einen Eindruck ermöglichen, ob die jeweiligen Antikörper weiterhin spezifisch ihren Analyten nachweisen können und ob der Ansatz für spätere Multiplex-Verfahren genutzt werden kann. Diese Überprüfung ist notwendig, da unter realen Bedingungen ein Konsum mehrerer Drogen bzw. die Anwesenheit von Metaboliten und Abbauprodukten in der Probe möglich ist. Zum Vergleich und besseren Einschätzung der Ergebnisse wird zusätzlich eine Kontrolle gezeigt, bei der jeweils nur die reine Droge im Serum vorhanden war bzw. nur der jeweilige spezifische primäre Antikörper verwendet wurde.

Mit Ausnahme von Benzoyllecgonin wurden die jeweiligen Experimente mindestens einmal wiederholt.

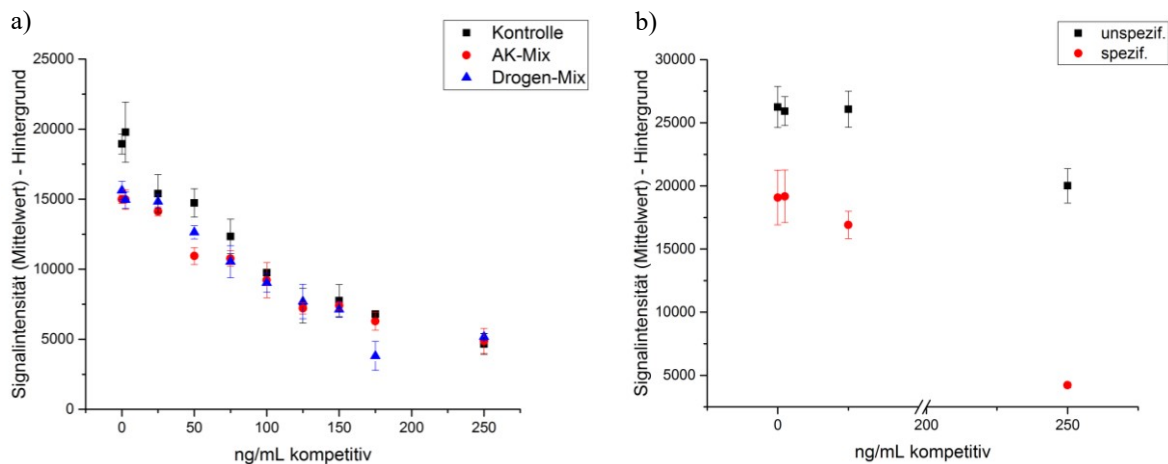


Abbildung 39: a) Nachweis von MDMA unter Zugabe mehrerer Drogen (blau) und Drogen-spezifischer Antikörper (rot). Als Vergleich dient ein Versuch in dem nur MDMA und der anti-MDMA Antikörper MD1 vorhanden waren (schwarz). b) Nachweis von MDMA unter Zugabe verschiedener primärer Antikörper und Vergleich des Ergebnisses bei Verwendung von validierten (rot) und kreuzreagierenden (schwarz) Antikörpern. Vom MDMA-BSA Konjugat wurde 500 ng/mL immobilisiert. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus Triplikaten subtrahiert mit dem Mittelwert des Hintergrunds (Karbonatpuffer). Der Nachweis erfolgte mit einem primären anti-MDMA Antikörper (1:2.000) mit anschließender Detektion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (1:1.000). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 39a zeigt, dass MDMA auch bei der Verwendung mehrerer Drogen oder primärer Antikörper spezifisch und mit gleicher Sensitivität nachgewiesen werden kann und der Verlauf der Eichkurve einen sehr ähnlichen Verlauf hat. Zur Kontrolle nur mit MDMA waren nur geringe Signalunterschiede zu beobachten. Am Beispiel von MDMA wurde zusätzlich überprüft, ob eine Messung beeinflusst werden kann, wenn nicht nur als spezifisch klassifizierte primäre Antikörper verwendet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 39b zu sehen. Sobald Antikörper enthalten sind, die als kreuzreagierend in der vorangegangenen Qualitätskontrolle klassifiziert wurden, wurde die Signalabnahme bei einer Competition deutlich gemindert. Das bedeutet, dass der Drogennachweis nicht mehr in ausreichender Sensitivität durchgeführt werden kann. Das Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit der Antikörpervalidierung.

Als Vergleich dienen die Nachweise mit Antikörper- bzw. Drogengemischen von Benzoyllecgonin (Abbildung 40a) und Methadon (Abbildung 40b).

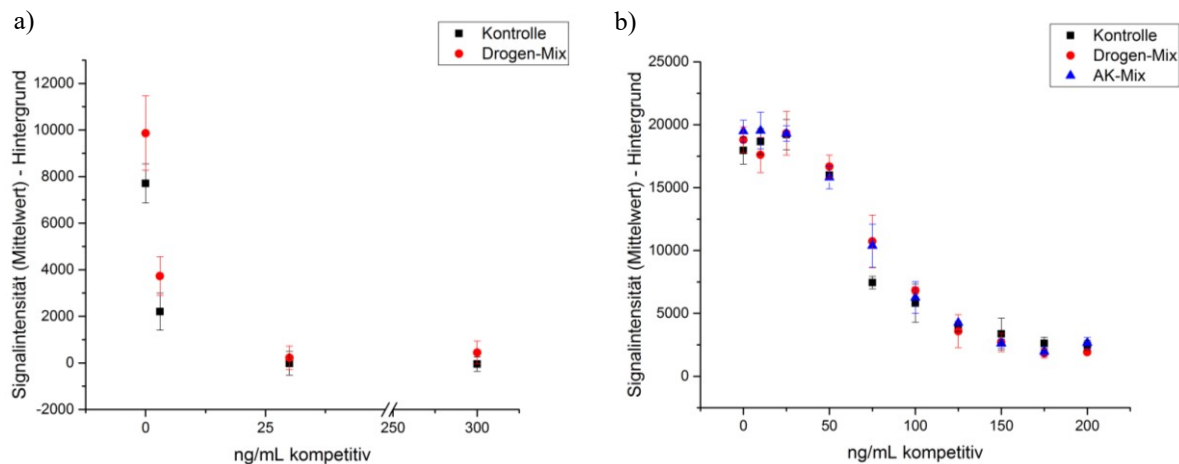


Abbildung 40: a) Nachweis von Benzoylcegonin unter Zugabe mehrerer Drogen (rot). Als Vergleich dient ein Versuch in dem nur Benzoylcegonin und der anti-Benzoylcegonin Antikörper B1 vorhanden waren (schwarz). Vom Benzoylcegonin-BSA Konjugat wurde eine Konzentrationsreihe immobilisiert. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus Triplikaten subtrahiert mit dem Mittelwert des Hintergrunds (Karbonatpuffer). Der Nachweis erfolgte mit einem primären anti-Benzoylcegonin Antikörper (1:1.000) mit anschließender Detektion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (1:1.000) b) Nachweis von Methadon unter Zugabe mehrerer Drogen (rot) und Drogen-spezifischer Antikörper (blau). Als Vergleich dient ein Versuch in dem nur Methadon und der anti-Methadon Antikörper Mt1 vorhanden waren (schwarz). Vom Methadon-BSA Konjugat wurde 1 µg/mL immobilisiert. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus Triplikaten subtrahiert mit dem Mittelwert des Hintergrunds (Karbonatpuffer). Der Nachweis erfolgte mit einem primären anti-Methadon Antikörper (1:500) mit anschließender Detektion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (1:1.000). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Beim Nachweis von Benzoylcegonin (Abbildung 40a) kam es zu geringen Unterschieden in den Signalintensitäten, sobald 9 Drogen im Serum vorhanden waren. Generell sind die Intensitäten des Drogen-Mix (rot) höher als die der Kontrolle (schwarz). Da auch die Signalintensität bei einer kompetitiven Drogenkonzentration von 0 ng/mL erhöht war, ist davon auszugehen, dass die Unterschiede auf Varianzen der Antikörperbindung zurückzuführen sind. Geringe Abweichungen in den Signalintensitäten wurden bereits bei Wiederholungen im kompetitiven ELISA zum Nachweis von Benzoylcegonin bei Zugabe nur einer Droge beobachtet (Abbildung 38c). Zunächst wurde davon ausgegangen, dass der primäre Antikörper trotz der verschiedenen Drogen in der Lage war spezifisch seinen Analyten zu binden. Durch den Produktionsstopp des Antikörpers konnten keine weiteren Versuche zur Überprüfung durchgeführt werden.

Während bei Benzoylcegonin und MDMA geringe Einflüsse der Gemische auf das Ergebnis erkennbar waren, war dies bei Methadon und dem Antikörper Mt1 (Abbildung 40b) nicht der Fall. Der Kurvenverlauf, welcher durch die zwei Plateauphasen mit einem dazwischenliegenden linearen Bereich gekennzeichnet ist, ist identisch unabhängig von der Anzahl der vorhandenen Drogen (rot) oder Drogen-spezifischer Antikörper (blau). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der anti-Methadon Antikörper Mt1 keine Kreuzreaktivitäten mit anderen primären Antikörpern und mit anderen Drogen aufweist.

Da bei den Nachweisen von Methadon, MDMA und Benzoyllecgonin nur sehr geringe bis keine Unterschiede zu beobachten waren, lässt sich schlussfolgern, dass die hier beschriebenen Antikörper auch im Multiplex-Verfahren genutzt werden können.

Nachdem die Stabilität der Eichkurven mit der Vermessung von Gemischen aus verschiedenen Drogen und primären Antikörpern überprüft und bestätigt wurde, wurde die Verifizierung des Versuchsaufbaus durchgeführt. Diese diente der Überprüfung, ob der Ansatz auch bei Blindproben bzw. authentischen Serumproben verlässliche Ergebnisse liefert. Dazu wurden exemplarisch für Methadon und Benzoyllecgonin Blindproben (Abschnitt 3.5.7) und für MDMA, Benzoyllecgonin und Methadon (Abschnitt 3.6) vom LKA Berlin bereitgestellte Serumproben vermessen. Die errechneten Konzentrationen wurden anschließend mit den Referenzdaten verglichen.

3.5.7. Analyse von im Labor hergestellter Blindproben

Zur Verifizierung des Versuchsaufbaus wurden von einer Drittperson gespikte Serumproben mit unbekannter Drogenkonzentration vorbereitet. Diese Proben wurden dann mit dem jeweiligen primären Antikörper versetzt und zusammen mit einer Eichkurve in der 96-well MTP inkubiert. Zunächst wurden jeweils 5 Proben vermessen, um in Wiederholungen auf die geforderten 10 Proben aufzustocken. Es wurden Blindproben für Benzoyllecgonin (Abbildung 41) und Methadon (Abbildung 42) hergestellt und vermessen.

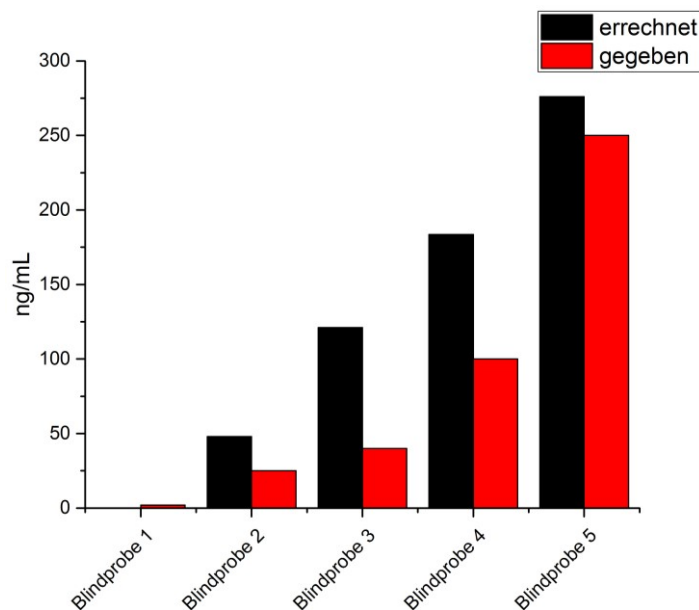


Abbildung 41: Ergebnis der Quantifizierung von Blindproben für Benzoylcegonin. Gegenübergestellt sind die mit Hilfe der Eichkurve errechneten Werte (schwarz) und die Referenzwerte (rot). Vom Benzoylcegonin-BSA Konjugat wurden 600 ng/mL immobilisiert. Der Nachweis erfolgte mit dem primären anti-Kokain Antikörper K1 (1:1.000) mit anschließender Detektion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (1:1.000). Die aus dem linearen Bereich der Eichkurve ermittelte Gleichung diente der Berechnung der Konzentrationen.

Die Abbildung 41 zeigt die Gegenüberstellung errechneter und gegebener Werte von fünf Blindproben für Benzoylcegonin. Mit Ausnahme der Blindprobe 1 weichen die Konzentrationsangaben stark von den vorgegebenen Werten ab. Die kalkulierten Werte sind immer höher, als die tatsächlich bestimmten. Lediglich bei Blindprobe 1, deren tatsächlicher Wert knapp über 0 ng/mL lag, war die Bestimmung mittels kompetitiven ELISA zufriedenstellend. Für die anderen Proben lagen die prozentualen Abweichungen bei 10 % (Blindprobe 5), 46 % (Blindprobe 4), 48 % (Blindprobe 2) und 77 % (Blindprobe 3). Die Abweichungen der errechneten Drogenkonzentrationen könnten durch der zur Berechnung genutzten Gleichung des linearen Bereichs begründet sein. Ein ähnliches Ergebnis lieferte die Bestimmung der Blindproben für Methadon (Abbildung 42).

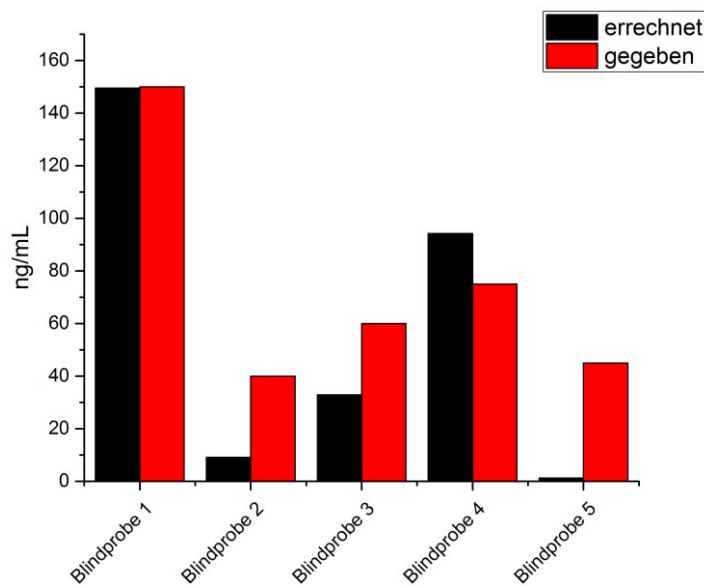


Abbildung 42: Ergebnis der Quantifizierung von Blindproben für Methadon. Gegenübergestellt sind die mit Hilfe der Eichkurve errechneten Werte (schwarz) und die Referenzwerte (rot). Vom Methadon-BSA Konjugat wurden 1 µg/mL immobilisiert. Der Nachweis erfolgte mit dem primären anti-Methadon Antikörper Mt1 (1:500) mit anschließender Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (1:1.000). Die aus dem linearen Bereich der Eichkurve ermittelte Gleichung diente der Berechnung der Konzentrationen.

Auch die Quantifizierung der Blindproben für Methadon zeigte zum Teil große Abweichungen zwischen errechneter und tatsächlicher Drogenkonzentration. Die Blindprobe 1 konnte zufriedenstellend quantifiziert werden. Für die übrigen Proben ergaben sich meist zu niedrige Konzentrationen als ursprünglich eingesetzt. Nur für die Blindprobe 4 wurde ein höherer Wert errechnet als tatsächlich vorlag. Beide Messungen der Blindproben zeigten zum Teil erhebliche Unterschiede. Bei der Bestimmung der Blindproben für Methadon lagen die prozentualen Abweichungen zwischen 21 % (Blindprobe 4), 82,5 % (Blindproben 3) und > 100 % (Blindproben 2 und 5). Um den Versuchsaufbau hinsichtlich einer realen Fragestellung und zur besseren Einschätzung der Qualität der Quantifizierungen zu überprüfen, wurden Serumproben, welche vom LKA Berlin bereitgestellt wurden, vermessen. Gespikete Blindproben sind durch die Herstellung im Labor nur bedingt dazu geeignet. Die Vermessung authentischer Proben entspricht zudem der Vorgabe der GTFCh. Daher wurde auf wiederholte Messungen mit 10 Blindproben verzichtet. Mit der Quantifizierung der authentischen Serumproben soll auch der Vergleich zwischen massenspektrometrischen und immunologischen Messungen vorgenommen werden. Diese Proben unterscheiden sich von den Blindproben hinsichtlich der Lagerung und vor allem in ihrer Zusammensetzung. Bei den vom LKA Berlin bereitgestellten Proben kann angenommen werden, dass neben den Serumbestandteilen und der Droge noch weitere Metaboliten vorhanden sind, welche Einfluss auf die Messung haben können.

3.6. Analyse von vom LKA bereitgestellten Serumproben und Vergleich mit massenspektrometrischen Daten

Die entwickelte Methode wurde auf eine reale Fragestellung angewendet, um die Qualität im Vergleich zu Standardmethoden zu überprüfen. Es wurden Serumproben vermessen, die vom Landeskriminalamt Berlin bereitgestellt wurden. Um eine Richtlinie der GTFCh zu erfüllen, müssen mindestens 10 authentische Proben mit einer 90 %-igen Übereinstimmung klassifiziert werden. Die Proben wurden Verkehrssündern, die unter Drogenverdacht standen, entnommen und anschließend die Drogenkonzentration massenspektrometrisch quantifiziert. Diese Referenzwerte wurden vom LKA Berlin bereitgestellt und konnten zum Vergleich mit berechneten Werten der kompetitiven ELISAs herangezogen werden. Die Serumproben wurden ca. 3 Jahre bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Durch die lange Lagerung und mehrfachem Auftauen, u.a. für die Aliquotierung und Transport, kann im Serum eine komplexe Zusammensetzung von Drogen, Metaboliten und anderen Stoffwechselprodukten vorliegen. Daher ist die verlässliche Quantifizierung dieser Serumproben anspruchsvoller, als die der im Labor hergestellten Blindproben.

Trotz gezeigter Lagerfähigkeit (Abbildung 36) der MTPs für die Quantifizierung wurden individuelle Eichkurven erstellt. Diese dienten zur Absicherung, um etwaige Varianzen in der Antikörperbindung erfassen zu können. Für Benzoylcegonin wurde keine Eichkurve parallel mitgeführt, da nur noch Restbestände des primären Antikörpers vorhanden waren, welcher zur Quantifizierung eingesetzt wurde und die Firma die Produktion des Antikörpers eingestellt hatte. Dafür wurden alle Wiederholungen der Eichkurve in eine zusammengefasst und die Gleichung des linearen Bereichs zur Berechnung genutzt. Für Methadon wurde seitens des LKA Berlin lediglich eine qualitative Bestimmung durchgeführt, sodass keine Konzentrationsangaben als Referenzwerte zur Verfügung standen. Dies ermöglicht nur eine Abschätzung, ob die Tendenz der Quantifizierungen korrekt sein könnte.

Die Serumproben wurden anonymisiert und mit einer Buchstaben-Zahlen-Kombination bezeichnet. Sofern Proben mehrfach vermessen wurden, wird der jeweiligen Bezeichnung ein kleiner Buchstabe (a, b, ...) hinzugefügt. Den mittels LC-/GC-MS erhaltenen Daten wurde ein Fehler von $\pm 15\%$ zugeordnet. Diese Angabe entspricht einem durch die GTFCh definierten akzeptablen Niveau. Die mittels kompetitiven ELISA erhaltenen Signalintensitäten ($n = 3$) wurden gemittelt und anschließend in die Gleichung der Eichgeraden eingesetzt. Anhand der Rohwerte der einzelnen Triplikate wurde die Standardabweichung berechnet und auf die errechneten Konzentrationen angewendet.

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus kompetitiven ELISA und LC-/GC-MS für Methadon, Benzoylcegonin und MDMA dargestellt (Abbildung 43 - Abbildung 45).

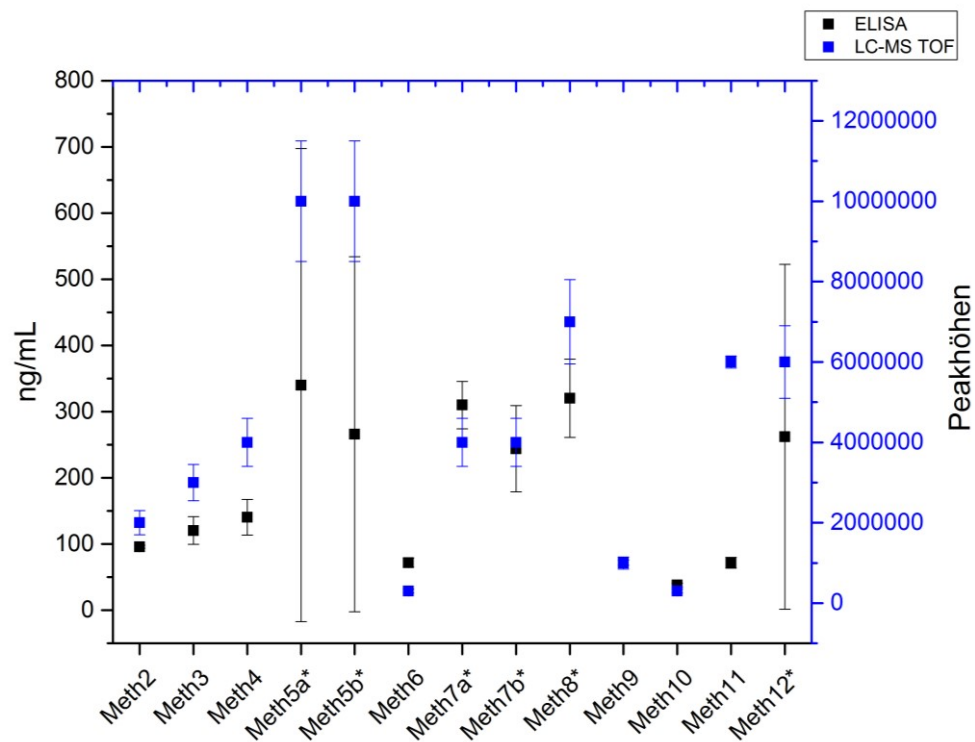


Abbildung 43: Vergleich der Ergebnisse einer Quantifizierung von Methadon. Gegenübergestellt werden hier die errechneten Konzentrationen durch ELISA (schwarz) und qualitative Peakhöhen durch LC-MS (blau). Mehrfachbestimmungen einer Probe werden durch den Zusatz eines Kleinbuchstaben markiert. Proben die mit einem * gekennzeichnet sind, wurden 1:3 verdünnt eingesetzt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 43 zeigt das Ergebnis von Quantifizierungen von Serumproben positiv für Methadon und die Gegenüberstellung von ELISA und LC-MS. Da von den LC-MS Messungen nur qualitative Daten vorhanden waren, lässt sich lediglich die Tendenz abschätzen. Generell lässt sich sagen, dass die Messungen ähnliche Ergebnisse lieferten. Die Verdünnungen der Proben Meth5 und Meth12 lieferten im Gegensatz zu den anderen Proben einen sehr hohen Fehler, was ein Effekt der Probenvorbereitung sein kann. Die wiederholten Messungen der Proben Meth5 und Meth7 lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die Abweichungen zwischen den jeweiligen Berechnungen der Wiederholungen lagen bei 22 %. Erstellt man eine Rangliste mit den jeweiligen Werten, so ergeben sich gute Übereinstimmungen zwischen den ELISA Werten und den LC-MS Werten. Als Ausnahme ist die Probe Meth11 zu nennen. Diese wäre im Ranking beim ELISA mit einem geringen Wert geführt worden, gehörte aber nach der LC-MS Messung zu den Proben mit den höchsten Werten. Werden die Verhältnisse der jeweiligen Methode zwischen den Proben miteinander verglichen, ergibt sich folgendes:

- gleiche Verhältnisse bei: Proben Meth3 zu Meth11 und Meth12; Meth4 zu Meth8 und Meth2 zu Meth4 und Meth7
- geringe Abweichungen (max. Faktor 2) in den Verhältnissen bei: Proben Meth7 zu Meth4 und Meth8; Meth10 zu Meth6
- große Abweichungen (Faktor > 2) in den Verhältnissen bei: Meth9 zu Meth5, Meth3 zu Meth6 und Meth10; Meth11 zu Meth12

Anhand der Verhältnisse lässt sich schlussfolgern, dass die Vergleichbarkeit beider Methoden in diesem Fall nur bedingt gegeben ist. Es wurden jedoch quantitative mit qualitativen Daten verglichen, sodass ein direkter Vergleich nicht möglich war.

Als nächstes sollen ELISA und GC-MS Messungen zur Quantifizierung von Benzoyllecgonin verglichen werden (Abbildung 44). Da für den Nachweis von Benzoyllecgonin keine individuelle Eichkurve mitgeführt werden konnte, wurde durch die Zusammenfassung aller Eichkurven durch die Bestimmung des Mittelwertes eine allgemein gültige Eichgerade erstellt.

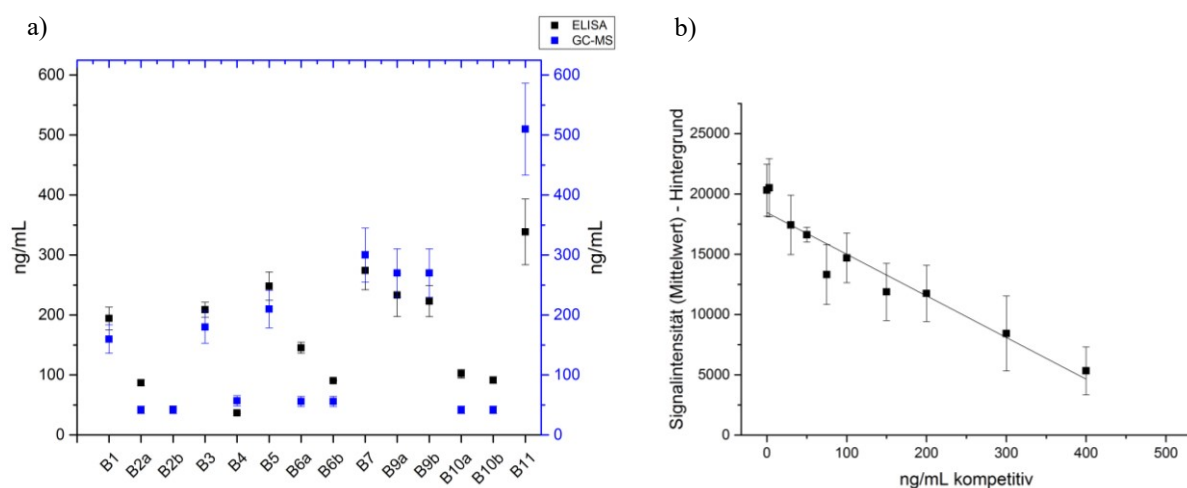


Abbildung 44: a) Vergleich der Ergebnisse einer Quantifizierung von Benzoyllecgonin. Gegenübergestellt werden hier die errechneten Konzentrationen durch ELISA (schwarz) und durch GC-MS (blau). Mehrfachbestimmungen einer Probe werden durch den Zusatz eines Kleinbuchstaben markiert. b) Zusammengefasste Eichgerade für Benzoyllecgonin mit linearem Fit. Diese wurde durch die Berechnung des Mittelwertes aller erstellten Eichkurven erhalten. Der lineare Fit ist durch eine Korrelation von 0,92 gekennzeichnet. Die erhaltene Gleichung $y = -35,36x + 18.659$ wurde zur Konzentrationsberechnung im ELISA verwendet. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

In Abbildung 44a ist die Quantifizierung von Benzoyllecgonin im Serum gezeigt. Prinzipiell liefern beide Messmethoden sehr ähnliche Ergebnisse. Dies wird durch ein gutes Pearson R von 0,93 belegt. Die Klassifizierung der einzelnen Proben anhand des Richtwertes von 30 ng/mL als positiv oder negativ wäre mit beiden Methoden identisch. Zusätzlich konnten wiederholte Messungen eine gute Reproduzierbarkeit, z.B. für die Proben B9 mit einer Abweichung zwischen den Wiederholungen von 4 % und B10 mit 10 %, zeigen. Die größte Abweichung

wurde bei der Probe B2 mit 51 % beobachtet. Zwischen den aufgetragenen Konzentrationen beider Methoden lagen die prozentualen Abweichungen zwischen 1 % (Probe B2b) und 62 % (Probe B6a) und im Mittel ca. bei 30 %. Auffallend ist, dass je höher die vorhandene Drogenkonzentration im Serum war, desto höher die Messfehler waren. Beim ELISA ist der Fehler bei hohen Benzoyllecgonin-Konzentrationen in den vom LKA Berlin bereitgestellten Serumproben durch die Lage außerhalb der Eichgeraden begründet. Diese Proben müssten in einer Wiederholung verdünnt eingesetzt werden, um eine Quantifizierung zu ermöglichen. Diese Versuche konnten auf Grund der geringen Restmenge des primären Antikörpers nicht durchgeführt werden. Zur Berechnung der Konzentrationen wurde eine zusammengefasste Eichgerade (Abbildung 44b) verwendet. Dies könnte zu geringen Abweichungen zu den gegebenen GC-MS Daten geführt haben.

Im Folgenden wird die Quantifizierung für MDMA gezeigt (Abbildung 45). Auch hier konnten Konzentrationsangaben aus einem kompetitiven ELISA und GC-MS Messungen verglichen werden.

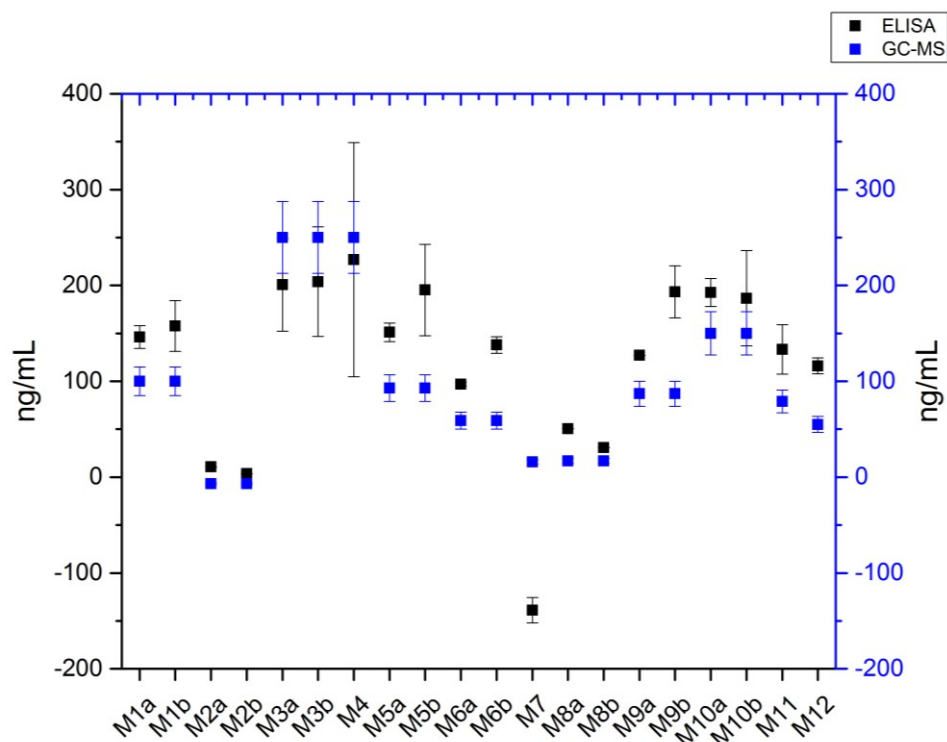


Abbildung 45: Vergleich der Ergebnisse einer Quantifizierung von MDMA. Gegenübergestellt werden hier die errechneten Konzentrationen durch ELISA (schwarz) und durch GC-MS (blau). Mehrfachbestimmungen einer Probe werden durch den Zusatz eines Kleinbuchstaben markiert. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 Messwerten aus einem Versuch. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 45 zeigt den Vergleich von Konzentrationsbestimmungen von MDMA im Serum mittels ELISA und GC-MS. Es war möglich sehr ähnliche Ergebnisse im Vergleich zur

Standardmethode zu erzielen. Bei dem Vergleich beider Methoden konnte ein Pearson R von 0,85 erzielt werden. Zusätzlich war die Reproduzierbarkeit der Mehrfachbestimmungen, wie von den Proben M1 (7 % Abweichung), M3 (1,6 % Abweichung) und M10 (3 % Abweichung), sehr gut. Die Probe M8 wurde in beiden Wiederholungen als falsch-positiv klassifiziert. Hier wurde auch die höchste Abweichung zwischen den Wiederholungen mit 64 % (ELISA Probe M8a und M8b) beobachtet. Zwischen den Konzentrationen von ELISA und GC-MS lagen die prozentualen Abweichungen zwischen den Methoden im Bereich von 10 % (Probe M4) und 66 % (Probe M8) und im Mittel ca. bei 38 %. Auch hier fällt auf, dass die Messfehler mit steigender Drogenkonzentration ebenfalls zunehmen. In diesem Fall liegen diese Konzentrationen am Rand des Bereiches, welche durch die Eichgerade im ELISA abgedeckt wird. Dies könnte zu dem erwähnten Fehler führen.

Generell lässt sich festhalten, dass die Quantifizierungen von Drogen-positiven Serumproben mit immunologischen und massenspektrometrischen Verfahren bis auf wenige Ausnahmen vergleichbare Ergebnisse lieferten.

3.7. Miniaturisierung des Versuchsaufbaus auf Microarrays

Der nächste Schritt war die Übertragung des kompetitiven ELISAs auf Microarrays. Dieser Schritte sollte u.a. einen parallelen Nachweis ermöglichen, den Verbrauch der Reagenzien minimieren und einen höheren Durchsatz ermöglichen. Um möglichst viele Proben untersuchen zu können und eine MTP am besten nachzubilden, wurde in einem 16-Kammer Format gearbeitet. In jede der Kammern wurden exakt die selben Analyten immobilisiert. Die Konjugate, Antikörper und Kontrollen wurden mit Hilfe eines nicht-Kontakt Dispensiersystems auf Epoxy-beschichtete Objektträger aufgetragen. Nach über Nacht Lagerung fand dann der Versuch statt, der dem Protokoll eines kompetitiven ELISAs entspricht.

3.7.1. Überprüfung der Funktionalität der Antikörper

Zunächst wurde getestet, ob die primären Antikörper, welche im ELISA validiert wurden, auch auf dem Microarray das jeweilige Drogen-BSA Konjugat spezifisch nachweisen können. Zusätzlich wurde überprüft, ob eine Konkurrenz möglich ist. Für eine erste Einschätzung wurde eine hohe kompetitive Konzentration gewählt.

Im Folgenden wird dargestellt, ob ein spezifischer Nachweis des Drogen-BSA Konjugats (schwarz) und eine Konkurrenz (rot) möglich ist. Zunächst sollte Methadon-BSA mit dem Antikörper Mt1 nachgewiesen werden (Abbildung 46).

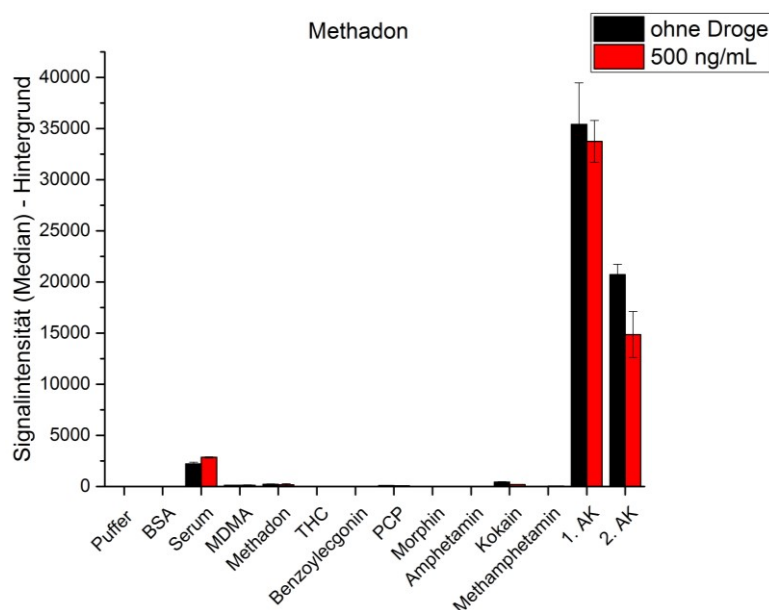


Abbildung 46: Ergebnis eines Microarrays für Methadon. Es wurde 1 µg/mL des Methadon-BSA Konjugats immobilisiert. Anschließend wurde ein Blockierschritt mit 2 % BSA durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem in Serum angesetzten primären Antikörper Mt1 (1:100) folgte die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Es wurde ein direkter Nachweis (schwarz) und ein kompetitiver Ansatz (rot) durchgeführt. Kompetitiv wurden 500 ng/mL reines Methadon eingesetzt. Die Auswertung der Spots erfolgte mit GenePix Pro 7. Von den Replikaten aus einem Versuch wurde der Median gebildet und davon der lokale Hintergrund abgezogen. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 46 zeigt das Ergebnis eines Microarrays zum Nachweis von Methadon-BSA. Dieser war nicht erfolgreich. Die gemessenen Werte waren deutlich geringer als die des Serums und wurden damit als Hintergrundrauschen deklariert. Ähnlich schwache Signale wie für Methadon-BSA wurden für MDMA-BSA und Kokain-BSA gemessen. Neben dem Serum waren nur noch die Positivkontrollen, d.h. der anti-Methadon Antikörper Mt1 und der sekundäre Antikörper, nachzuweisen. Auf Grund dieses Resultats wurde der Nachweis von Methadon auf Microarrays verworfen.

Ähnliche Ergebnisse wurden beim Nachweis von THC-BSA gemessen. Die Auswertung ist im Anhang zu finden (Abbildung 75). Das THC-BSA Konjugat konnte zwar nachgewiesen werden, aber die gemessenen Signalintensitäten waren vergleichbar mit denen vom Serum. Dies bedeutet, dass die Signale von THC-BSA im Hintergrund liegen. Weitere niedrige Werte wurden für MDMA-BSA und Kokain-BSA bestimmt. Weiterhin konnte auch kein Einfluss des kompetitiven THCs beobachtet werden, so dass als Folge der Nachweis von THC auf Microarray ebenfalls verworfen wurde.

Als nächstes wurde der Nachweis von Benzoyllecgonin untersucht. Im ELISA erfolgte die Quantifizierung mittels dem anti-Kokain Antikörper K1, welcher kein Kokain im Serum

nachweisen konnte. Ob sich der Antikörper auf Microarrays genauso verhält, wurde geprüft (Abbildung 47).

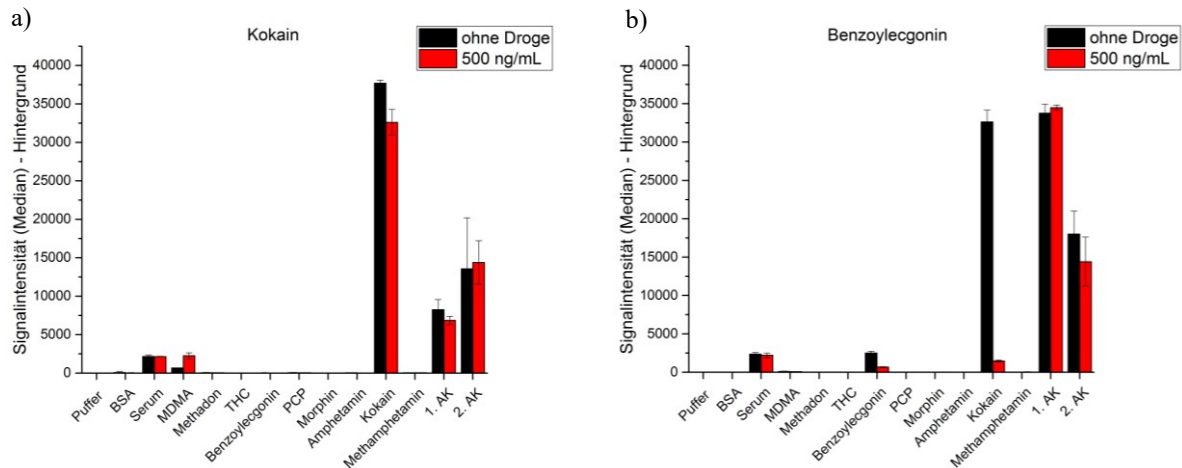


Abbildung 47: Ergebnis eines Microarrays für a) Kokain mit dem Antikörper K3 und b) Benzoylecgonin mit dem K1 Antikörper. Es wurde 500 ng/mL des Kokain-BSA Konjugats und 600 ng/mL des Benzoylecgonin-BSA Konjugats immobilisiert. Anschließend wurde ein Blockierschritt mit 2 % BSA durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem in Serum angesetzten primären Antikörper (1:100) folgte die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Es wurde ein direkter Nachweis (schwarz) und ein kompetitiver Ansatz (rot) durchgeführt. Kompetitiv wurden je 500 ng/mL a) Kokain und b) Benzoylecgonin eingesetzt. Die Auswertung der Spots erfolgte mit GenePix Pro 7. Von den Replikaten aus einem Versuch wurde der Median gebildet und davon der lokale Hintergrund abgezogen. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 47a zeigt einen spezifischen Nachweis für Kokain-BSA. Neben den Positivkontrollen wurde wieder das Hintergrundsignal vom Serum und MDMA-BSA auf selben Level gemessen. Im kompetitiven Ansatz konnte eine Signalabnahme beobachtet werden. Beim Nachweis von Benzoylecgonin (Abbildung 47b, schwarz) konnte Benzoylecgonin-BSA nur mit ähnlichen Signalintensitäten wie Serum nachgewiesen werden. Es konnte eine Signalabnahme bei einer Kompetition durch freies Benzoylecgonin (Abbildung 47b, rot) beobachtet werden. Zusätzlich wurde das Kokain-BSA Konjugat detektiert. Dabei wurden sehr hohe Signalintensitäten erreicht. Weiterhin war eine Signalabnahme bei Zugabe von freiem Benzoylecgonin zu beobachten. In nachfolgenden Experimenten müsste getestet werden, ob auch freies Kokain detektiert wird. Diese konnten nicht durchgeführt werden, da die Produktion des anti-Kokain Antikörpers K1 eingestellt wurde.

Ein Beispiel für einen erfolgreichen spezifischen kompetitiven Nachweis ist MDMA-BSA (Abbildung 48).

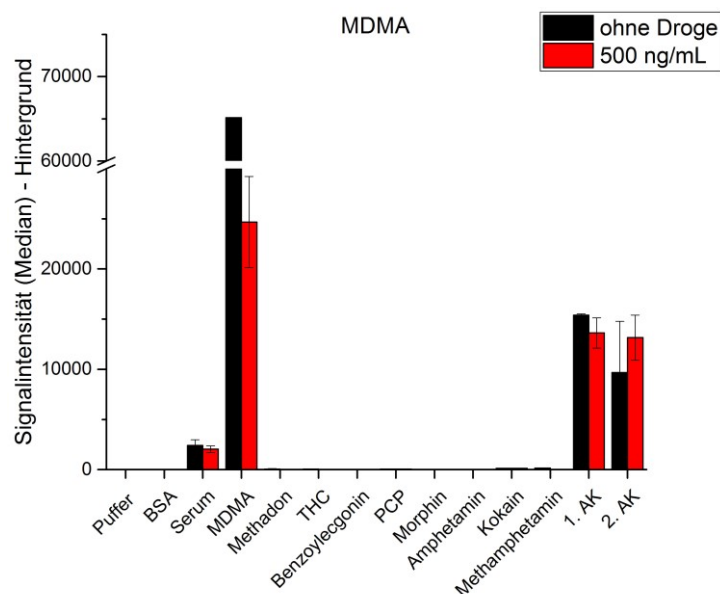


Abbildung 48: Ergebnis eines Microarrays für MDMA-BSA. Es wurde 1 µg/mL des MDMA-BSA Konjugats immobilisiert. Anschließend wurde ein Blockierschritt mit 2 % BSA durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem in Serum angesetzten primären Antikörper MD1 (1:100) folgte die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Es wurde ein direkter Nachweis (schwarz) und ein kompetitiver Ansatz (rot) durchgeführt. Kompetitiv wurden 500 ng/mL MDMA eingesetzt. Die Auswertung der Spots erfolgte mit GenePix Pro 7. Von den Replikaten aus einem Versuch wurde der Median gebildet und davon der lokale Hintergrund abgezogen. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 48 zeigt den erfolgreichen Nachweis des MDMA-BSA Konjugats und die Kompetition mit freiem MDMA im Serum. Wie in den zuvor gezeigten Beispielen (Abbildung 46 und Abbildung 47) waren geringe Signale für das Serum zu beobachten. Es waren keine weiteren Signale von anderen Konjugaten neben den Positivkontrollen zu beobachten. Neben dem spezifischen Nachweis vom MDMA-BSA Konjugat konnte erfolgreich eine Kompetition mit MDMA erreicht werden.

Durch diese Ergebnisse konnte als nächster Schritt wiederum eine Eichgerade für MDMA für eine Quantifizierung etabliert werden. Zunächst wurde aber auch hier der Einfluss des Serums und der Blockierschritt genauer betrachtet.

3.7.2. Optimierung der Versuchsbedingungen

Auch für die Durchführung der Microarrays wurden verschiedene Versuchsbedingungen optimiert bzw. genauer betrachtet. Zunächst wurde der Einfluss des Serums auf die Signalintensitäten untersucht (Abbildung 49). Dabei wurde verglichen, inwiefern das Ergebnis beeinflusst wird, wenn Blockierung und die Inkubation mit dem primären Antikörper in 2 % BSA und in Serum durchgeführt wurde.

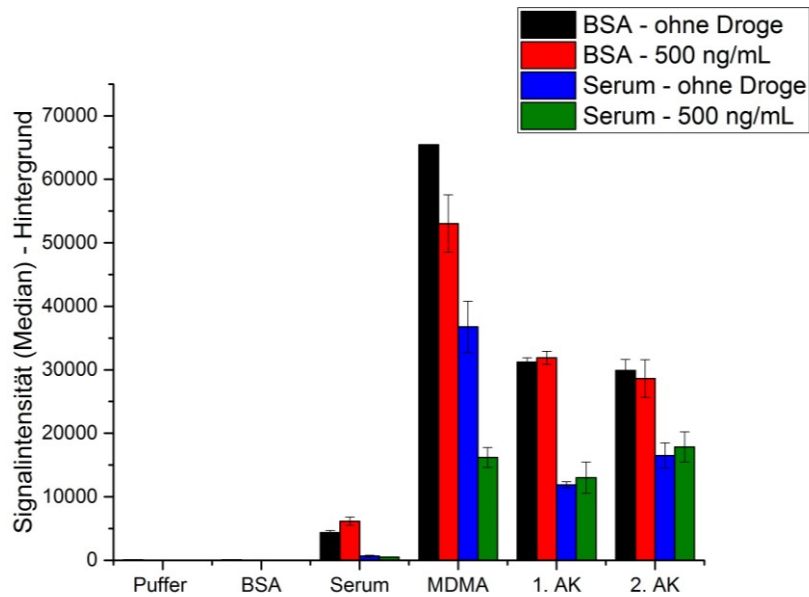


Abbildung 49: Ergebnis eines Microarrays für MDMA-BSA. Es wurde 1 µg/mL des MDMA-BSA Konjugats immobilisiert. Anschließend wurde ein Blockierschritt durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper MD1 (1:100) folgte die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Gegenübergestellt sind Blockierung und Inkubation mit dem primären Antikörper in 2 % BSA (schwarz, rot) und Serum (blau, grün). Es wurde ein ELISA (schwarz, blau) und ein kompetitiver Ansatz (rot, grün) durchgeführt. Kompetitiv wurden 500 ng/mL MDMA eingesetzt. Die Auswertung der Spots erfolgte mit GenePix Pro 7. Von den Replikaten aus einem Versuch wurde der Median gebildet und davon der lokale Hintergrund abgezogen. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Das Ergebnis eines Microarrays für MDMA-BSA zeigt den Vergleich der Versuchsdurchführung in verschiedenen Lösungen. Generell wurde beobachtet, dass die Durchführung in 2 % BSA zu höheren Signalintensitäten führt. Weiterhin wurde für immobilisiertes Serum bei der Verwendung von BSA höhere Signale beobachtet als bei einer Blockierung und Antikörperinkubation mit Serum. Die Konkurrenz und die Vergleichbarkeit der Signale für die Positivkontrollen war sowohl mit BSA, als auch mit Serum erfolgreich.

Als weitere Optimierung wurden verschiedene Lösungen zum Absättigen freier Bindestellen der Oberfläche getestet. Dazu wurden die Signalintensitäten der immobilisierten Kontrollen bei Verwendung verschiedener Blockierungslösungen ausgewertet (Abbildung 50).

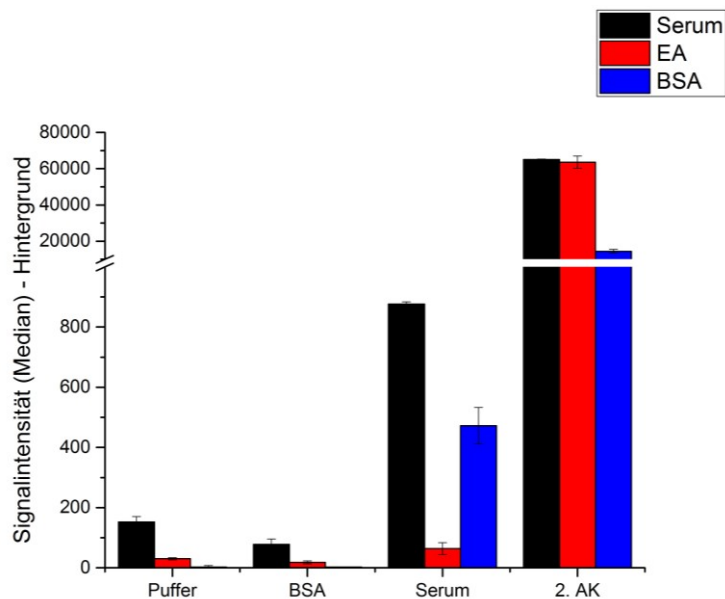


Abbildung 50: Ergebnis eines Microarrays zur Überprüfung der Blockierung mit Serum (schwarz), Ethanolamin (rot) und 2 % BSA (blau). Als Negativkontrollen wurden Karbonatpuffer, BSA und Serum und als Positivkontrolle der fluoreszenzmarkierte Antikörper immobilisiert. Nach dem Blockierschritt mit der jeweiligen Lösung folgte die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Die Auswertung der Spots erfolgte mit GenePix Pro 7. Von den Replikaten aus einem Versuch wurde der Median gebildet und davon der lokale Hintergrund abgezogen. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 50 zeigt die Gegenüberstellung verschiedener Blockierungslösungen. Wenn mit Serum (schwarz) blockiert wurde, waren geringe Signale für den Puffer und BSA zu beobachten. Ein etwas höheres Signal wurde für das Serum detektiert. Das Signal des sekundären Antikörpers befand sich in der Sättigung. Dies war ebenfalls für die Blockierung mit Ethanolamin (rot) zu beobachten. Für Ethanolamin waren nur sehr geringe Signale für die Negativkontrollen Puffer, BSA und Serum zu beobachten. Für die Blockierung mit 2 % BSA (blau) waren keine Signale für den Puffer und BSA messbar, aber geringe Intensitäten für das Serum. Zusätzlich wurden für den sekundären Antikörper deutlich geringere Signalintensitäten erreicht. Nach Abwägung verschiedener Kriterien, welche vor allem die Komplexität des Versuchsablaufs betrafen, wurde für folgende Versuche 2 % BSA als Blockierungslösung gewählt. Neben den sehr schwachen Signalen für die Negativkontrollen bei der Verwendung von BSA, führte die Toxizität von Ethanolamin und die höheren Kosten bzw. die höheren Hintergrundsignale vom Serum zu dieser Entscheidung.

Nach der Optimierung und Überprüfung verschiedener Versuchsbedingungen wurde die Etablierung der Eichkurve für MDMA realisiert.

3.7.3. Etablierung einer Quantifizierung auf Microarrays

Nach der Überprüfung der Funktionsweise der primären Antikörper und einiger Versuchsbedingungen, wurde ein kompetitiver Nachweis von MDMA zur Quantifizierung etabliert (Abbildung 51). Dazu wurden 10 Kammern des Systems nach der Blockierung mit einer Lösung bestehend aus Serum, dem anti-MDMA Antikörper MD1 und steigenden Konzentrationen reiner Droge inkubiert. Die kompetitiven Drogenkonzentrationen waren identisch mit denen im ELISA (Abbildung 38b).

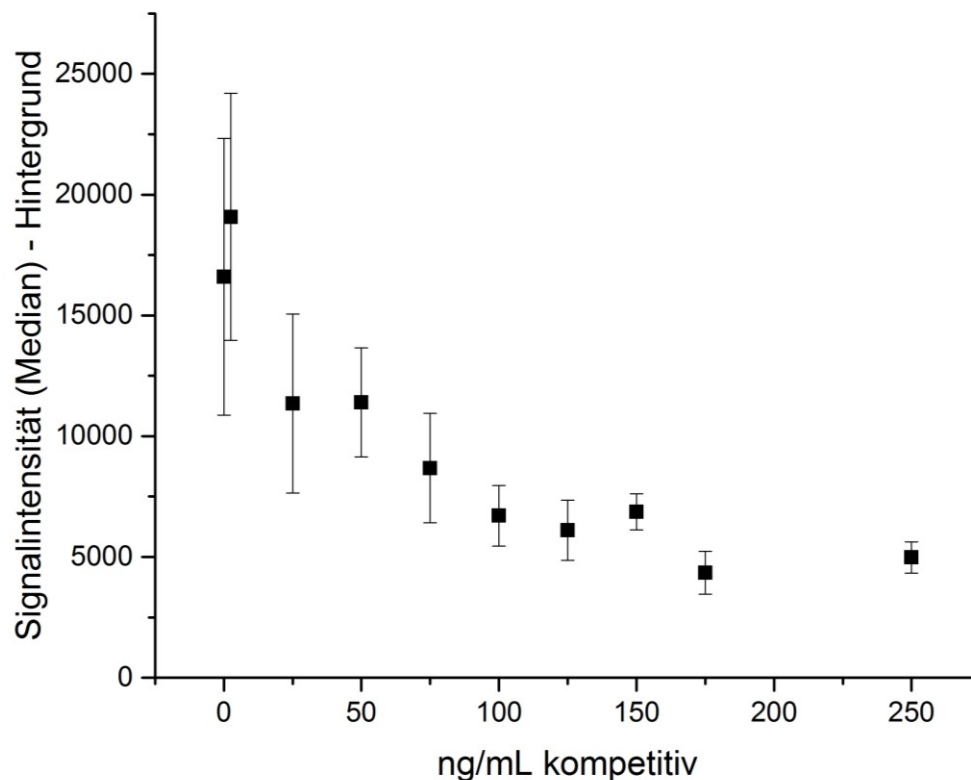


Abbildung 51: Ergebnis eines kompetitiven Nachweises von MDMA auf einem Microarray. Es wurde 1 µg/mL des MDMA-BSA Konjugats immobilisiert. Anschließend wurde ein Blockierschritt mit 2 % BSA durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem in Serum angesetzten primären Antikörper MD1 (1:100) folgte die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Die Auswertung der Spots erfolgte mit GenePix Pro 7. Von den Replikaten aus einem Versuch wurde der Median gebildet und davon der lokale Hintergrund abgezogen. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.

Die Abbildung 51 zeigt die Auswertung eines Microarrays zum kompetitiven Nachweis für MDMA. Die Kurve zeigte einen geringfügig anderen Verlauf im Vergleich zum ELISA (Abbildung 38b). Im ELISA wurde über den gesamten Bereich eine Linearität beobachtet. Beim Microarray wurde der lineare Bereich von kurzen Plateauabschnitten flankiert. Daher umfasst der lineare Bereich für die Quantifizierung mit Microarrays die Konzentrationen 50 ng/mL bis 175 ng/mL und ist damit im Vergleich zum ELISA etwas geringer. Zusätzlich wäre damit der Richtwert von 25 ng/mL nicht abgedeckt. Um die beiden Methoden etwas besser

vergleichen zu können, wurden die Intensitäten von 0 ng/mL kompetitiver Drogenkonzentration auf 100 % gesetzt und die folgenden Werte jeweils dazu ins Verhältnis gesetzt. Diese Prozentangaben wurden anschließend über die kompetitive Drogenkonzentration aufgetragen (Abbildung 52).

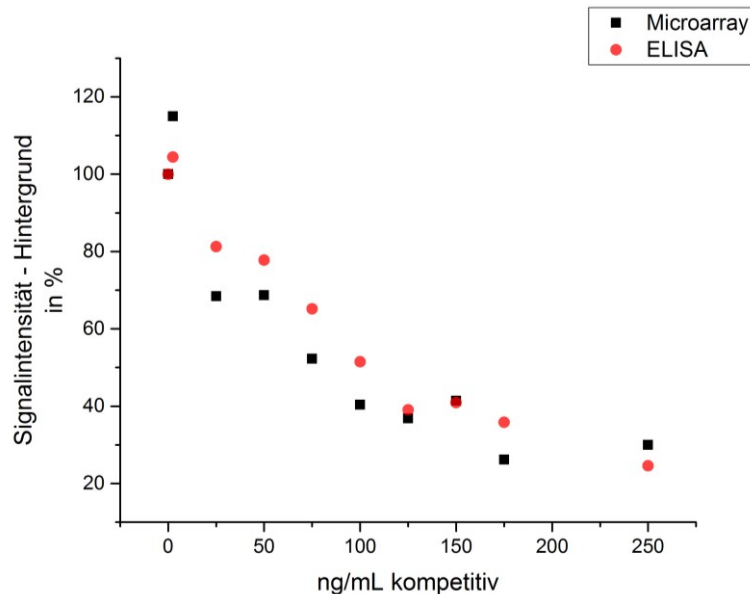


Abbildung 52: Vergleich einer Eichkurve für MDMA erhalten durch Microarray (schwarz) und kompetitiver ELISA (rot). Der Wert von 0 ng/mL wurde dazu auf 100 % gesetzt und die folgenden Werte dementsprechend umgerechnet.

Die Gegenüberstellung beider verwendeter Methoden zeigte eine gute Vergleichbarkeit von Microarray und ELISA. Der Verlauf der Eichkurve ist nahezu identisch. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass für MDMA ein guter Plattformvergleich gegeben ist. Diese Aussage müsste in weiteren Experimenten bestätigt werden.

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Abschließend werden in der Tabelle 14 die Ergebnisse zusammengefasst. Dabei wird aufgeführt, ob ein kompetitiver ELISA und anschließend eine Eichkurve zur Quantifizierung etabliert werden konnte. Sofern eine Eichkurve erreicht werden konnte, wurde mit Hilfe der Wiederholungen die CVs als Indiz für die Reproduzierbarkeit berechnet. Daraufgehend wird aufgelistet, ob eine Quantifizierung von Serumproben bereitgestellt vom LKA und ein Übertrag auf Microarrays möglich war. Abschließend wird die Anzahl der getesteten Antikörper pro Droge angegeben.

Tabelle 14: Übersicht der Ergebnisse für die einzelnen Drogen. Aufgeführt sind die einzelnen Methoden des ELISAs, Quantifizierungen von Serumproben bereitgestellt vom LKA und dem Nachweis auf Microarrays.

Droge	Komp. ELISA	Eichkurve	CV	Quantifizierung LKA-Proben	Microarray (MAs)	# Antikörper
PCP	Auf Grund unspezifischer Antikörper bereits im Validierungsprozess ausgeschlossen.					2
Morphin						3
Amphetamin						4
Methamphetamin	Keine Unterscheidung mit den getesteten Antikörpern möglich.					12
Kokain	Antikörper K1-K3 erkennen im ELISA das Konjugat, aber nicht freies Kokain, sondern nur freies Benzoyllecgonin. Diese werden daher zur Quantifizierung von Benzoyllecgonin verwendet.				Auf MAs wird freies Kokain erkannt. Eine weitere Überprüfung ist notwendig.	6
THC	+	-	-	-	-	3
Benzoyllecgonin	+	+	3 – 15 %	+	-	2
Methadon	+	+	4 – 13 %	+	-	1
MDMA	+	+	2 – 12 %	+	+	1

Die Tabelle zeigt den unterschiedlichen Fortschritt bei dem Nachweis einzelner Drogen. Einige der getesteten Antikörper zeigten Kreuzreaktivitäten innerhalb einer Substanzklasse, z.B. für die Gruppe der Amphetamine. Anti-Kokain Antikörper, wie z.B. K1 oder K3 waren nicht in der Lage freies Kokain im Serum zu binden, waren jedoch spezifisch für dessen Hauptabbauprodukt Benzoyllecgonin.

In Summe wurden 33 Antikörper getestet, wovon 5 ($\approx 15\%$) im kompetitiven ELISA einen spezifischen Nachweis zeigten. Mit 3 Antikörpern ($\approx 9\%$) konnte eine Eichkurve und damit eine Quantifizierung von Serumproben erreicht werden.

Bei Vorliegen spezifischer Antikörper konnten sensitive und reproduzierbare Nachweise etabliert werden, welche mit Variationskoeffizienten bis maximal 15 % und Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,9 belegt werden.

4. Diskussion

In diesem Abschnitt werden die zuvor gezeigten Ergebnisse diskutiert und die damit verbundenen Schlussfolgerungen für weitere Experimente erläutert. Weiterhin soll eine Einordnung der Ergebnisse bezüglich der Qualität und der gewonnenen Erkenntnisse anhand aktueller Literatur erfolgen. Dies soll zusätzlich helfen, weitere Anregungen für zukünftige Projekte zu erhalten.

4.1. Nachweis niedermolekulare Substanzen

Es wurden mehrere Ansätze zum Nachweis niedermolekularer Substanzen überprüft. Dazu zählten Aptamere und ELISA, welche z.B. als kompetitiver Ansatz aufgebaut waren (Abschnitte 2.7.3.5 und 2.7.5).

Weder bei der Verwendung von Aptameren, noch bei der Immobilisierung eines Drogen-positiven Serums konnte ein erfolgreicher bzw. sensitiver Nachweis einer Droge im Serum erbracht werden.

Der Nachweis von Drogen über Aptamere befindet sich noch in der Anfangsphase. Eine breitere Anwendung finden Aptamere in der Diagnostik, z.B. in dem Nachweis von Antibiotika [92,93] oder von Entzündungen [94].

Eine Literaturrecherche ergab für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen meist nur wenige oder keine Treffer. So wurden Ansätze zum Nachweis von Amphetamin [95] und Codein [96], welches zu den Opiaten gehört, beschrieben. Allein für Kokain wurden ausführlichere Studien durchgeführt. Mit Aptameren wurden zum Nachweis von Kokain verschiedene Nachweissysteme und Probenmaterialien genutzt. Nie *et al.* [97] nutzten einen enzymatischen Nachweis für Kokain in filtrierten Serum und erreichten damit ein Detektionslimit von 2,8 μM , welches ca. 84-fach über den Richtwert liegt. Andere Studien konnten Kokain mittels Aptameren auf einem Teststreifen [98] mit einer LOD von 500 μM oder mit einem Mikrofluidik-basierten Ansatz [99] mit einer LOD von 10 μM nachweisen. Die erreichten LODs liegen hier um einen Faktor von ca. 15.000 bzw. 300 über den in Deutschland geforderten Richtwert. Yang *et al.* [100] nutzten hingegen Abwasser als Probenmaterial und waren in der Lage 10 nM Kokain nachzuweisen.

Für Kokain liegt der Grenzwert im Serum bei 33 nM bzw. im Abwasser liegen die bisher nachgewiesenen Werte bei maximal 3 nM. Im gezeigten EMSA (Abbildung 13) wurden maximal 25 μM Kokain eingesetzt. Damit konnte keine der beschriebenen Studien Kokain mittels Aptameren in ausreichender Sensitivität in Serum nachweisen. Diese Beobachtungen

decken sich mit denen in der Einleitung (Abschnitt 1.2.2.3) beschriebenen Komplikationen, die sich bei der Verwendung von Aptameren für einen Drogennachweis im Serum ergeben. Dazu gehören eine geringere Affinität der Aptamere zur Droge, sowie eine schnellere Degradation der Sequenzen im Serum [46]. Weiterhin ist die Affinität von der Ausbildung von 3D-Strukturen, z.B. Haarnadelstrukturen, abhängig [101]. Die Ausbildung ist bei niedermolekularen Molekülen nicht möglich, was sich negativ auf die Spezifität auswirkt. Auf Grund dieser Erkenntnisse wird die Verwendung von Aptameren in Serum nicht empfohlen. Um einen Nachweis zu etablieren, müsste zunächst der Einfluss des Serums minimiert werden. Dies könnte über eine aufwendige Aufreinigung der Probe oder über Modifizierungen der Aptamere, die deren Stabilität verbessern, bewerkstelligt werden. Mögliche chemische Modifikationen wären u.a. Austausch des Phosphat-Rückgrats mit Schwefel oder das „end-capping“ des 3' oder 5' Terminus [102].

Während der Recherche konnten keine erfolgreichen Drogennachweise mittels einem ELISA mit immobilisierten Drogen-positiven Serumproben gefunden werden. Auch die in dieser Arbeit gezeigten Experimente (Abbildung 14) lieferten keine positiven Ergebnisse. Es ist davon auszugehen, dass vor allem die geringe Größe der Moleküle ein Problem darstellt. Bei der Immobilisierung von Serum in dem eine hohe Konzentration an Droge vorhanden war, ist davon auszugehen, dass sofern während der Immobilisierung ein Teil der freien Droge bindet, diese von Serumbestandteilen, wie Albumin, so überlagert wurden, dass keine Bindung des primären Antikörpers möglich war. Eine Verdünnung des Serums wurde nicht vorgenommen, da Beobachtungen gezeigt haben, dass die Signalintensitäten beim immobilisierten Serum und damit Kreuzreaktivitäten zunehmen. Dieser Effekt könnte dadurch auftreten, dass bei einer Verdünnung der Albuminanteil reduziert wird und andere Serumbestandteile, wie Antikörper oder Metabolite, mit Assaykomponenten reagieren und unspezifische Bindungen hervorrufen können. Jedoch könnte ein modifizierter Sandwich ELISA von Omi *et al.* [103] das Problem der geringen Größe umgehen. Ihnen war es möglich niedermolekulare Substanzen in Serum, wie Estradiol, in einem Sandwich ELISA mittels Chemilumineszenz sensitiv ($< \text{ng/mL}$) nachzuweisen. Dazu war eine Produktion eines monoklonalen Antikörpers, welcher den Komplex aus Analyt und Analyt-spezifischen Antikörper binden kann, notwendig. Ein Nachteil dieser Methode für das Ziel dieser Arbeit einen parallelen und quantifizierbaren Nachweis mehrerer Drogen zu etablieren, ist die Verdopplung der zu validierenden Antikörper und damit verbunden eine enorme Zunahme in Zeit und Kosten.

Der ELISA gehört für den Nachweis von Drogen zu den am häufigsten verwendeten Methoden neben der Massenspektrometrie. Dafür werden vor allem Enzym-basierte Nachweissysteme

und Urin als Probematerial verwendet [38,104]. Streifen- bzw. Schnelltests dienen primär als Vortest einer qualitativen Analyse, die Aufschluss über die Notwendigkeit einer quantitativen Messung gibt [105]. Zur Quantifizierung werden kommerziell erhältliche Kits, welche für einzelne Drogen bzw. Substanzklassen erhältlich sind, genutzt. Diese sind in der Lage in Serum, Urin oder Haaren Substanzen im ng/mL-Bereich zu detektieren [106,107]. Ein zu beachtender Faktor von Immunoassays ist jedoch die Kreuzreaktivität [37,108]. Für Vor- bzw. Schnelltests kann eine Kreuzreaktivität innerhalb einer Substanzklasse gewünscht sein, damit möglichst viele Substanzen detektiert werden. Sobald aber eine Quantifizierung durchgeführt werden soll, dürfen keinerlei unspezifische Bindungen auftreten. Daher ist eine stringente Antikörpervalidierung für einen spezifischen Drogennachweis nötig. Sowohl die aufgetretenen Kreuzreaktivitäten (Abbildung 22), als auch die Sensitivität im ng/mL-Bereich (Abbildung 28) decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Angaben. Abschließend gibt die Tabelle 15 einen Überblick über die Vor- und Nachteile der beschriebenen Methoden.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden zum Nachweis illegaler Drogen.

Methode	Vorteile	Nachteile
Aptamere	Herstellung, Modifizierbarkeit	Sensitivität
Kompetitive ELISAs	Sensitivität	Kreuzreaktivität erfordert aufwendige Antikörpervalidierung

Die Tabelle zeigt, dass jede Nachweismethode ihre individuellen Vor- und Nachteile besitzt, die für die jeweilige Anwendung gegeneinander abgewägt werden müssen. Um den Anspruch der Etablierung eines sensitiven Nachweises für Drogenkonsums gerecht zu werden, sind kompetitive ELISAs vorzuziehen.

4.2. Qualitätskontrolle

Innerhalb der Qualitätskontrolle wurde die Spezifität der verwendeten Antikörper überprüft. Auf Grund des angestrebten spezifischen und parallelen Nachweises einzelner Drogen mussten mögliche Kreuzreaktivitäten gegen andere Drogen und Versuchskomponenten ausgeschlossen werden. Zur Qualitätskontrolle wurden ELISA-Experimente und Western Blot Analysen durchgeführt.

Western Blots gelten seit langem als beliebte analytische Methode um eine Interaktion von Antikörper mit dem jeweiligen Analyten zu untersuchen [109]. ELISAs haben zusätzlich den

Vorteil eine Quantifizierung zu ermöglichen [110]. Für beide Methoden wurden sowohl gute Übereinstimmungen, als auch abweichende Ergebnisse publiziert [111,112]. Je nach Probenvorbereitung und der Interaktion der verwendeten Antikörper mit dem Analyten können Unterschiede auftreten. Eine Qualitätskontrolle der Antikörper und damit einhergehend der verwendeten Konjugate ist daher besonders relevant. Im Western Blot wurden die Konjugate vor allem als „Schmier“ beobachtet (Abbildung 18). Dieser Effekt liegt in der Kopplung von BSA und Droge bzw. in der Aggregation des BSAs begründet. Denn je mehr Drogenmoleküle an das BSA gekoppelt wurden, desto stärker erscheint das Konjugat auf einem Gel bzw. einer Membran als „Schmier“ [113]. Im ELISA konnten allgemein gute Sensitivitäten erreicht werden, die sich mit Daten aus Veröffentlichungen decken [114,115]. In der Tabelle 16 werden einige allgemeine Eigenschaften von Western Blot und ELISA zusammengefasst.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden für die Qualitätskontrolle.

Methode	Vorteile	Nachteile
Western Blot	<ul style="list-style-type: none"> • Sensitivität • geringes Probenvolumen • Informationen über Probenzusammensetzung 	<ul style="list-style-type: none"> • „Schmier“ • keine Quantifizierung • Probenvorbereitung • Probenauftrennung über gesonderte Methode
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • hoher Durchsatz • Sensitivität • keine Probenvorbereitung 	<ul style="list-style-type: none"> • hohes Probenvolumen

Für beide Methoden wurden Kreuzreaktivitäten beobachtet. Dies war vor allem für Substanzen innerhalb einer Substanzklasse, wie die Amphetamine (siehe Anhang Abbildung 56 und Abbildung 63), der Fall. Die unspezifischen Bindungen innerhalb einer Substanzklasse sind vor allem auf die geringen strukturellen Unterschiede zurückzuführen. Beispielsweise unterscheiden sich Amphetamin und Methamphetamin lediglich durch eine Methylengruppe und Benzoylecgonin entsteht als Hauptabbauprodukt von Kokain durch eine Abspaltung einer Methylestergruppe [116]. Auch für andere synthetische Drogen [29] oder Sekundärmetaboliten [117] wurden Kreuzreaktivitäten innerhalb einer Stoffgruppe oder Substanzklasse beschrieben. Die ausgeprägter auftretenden Kreuzreaktivitäten, z.B. des Antikörpers Mo2 (siehe Anhang Abbildung 61a), zwischen mehreren Drogen sind durch strukturelle Gemeinsamkeiten wie dem Trägermolekül BSA oder dem Grundbaustein der aromatischen Ringe zu erklären.

Die Spezifität des primären Antikörpers ist vor allem auf das zur Immunisierung verwendete Konjugat, und damit verbunden der Kopplungsmethode, zurückzuführen [118]. Die Kopplungsrate des Analyten an das Trägermolekül und die Position eines Linkers sind dabei die wichtigsten Faktoren [119,120]. Es wird für eine optimale Immunantwort und eine gute Sensitivität des Antikörpers eine Rate von Trägermolekül zu Analyten von mindestens 1:5 bis maximal 1:20 [120,121] und eine Synthese des Linkers an der meta-Position [121,122] empfohlen. Durch diese Konfiguration soll eine unspezifische Bindung des Antikörpers an das Trägermolekül vermieden werden [118].

Für beide Methoden gilt, dass jeder Antikörper individuell optimiert und validiert werden muss und dies in Abhängigkeit der angestrebten Anwendung und des verwendeten Probenmaterials [109,123]. Auf Grund des späteren Versuchsaufbaus und der oben genannten Vorteile wurde die Qualitätskontrolle mittels ELISA durchgeführt. Die folgende Abbildung (Abbildung 53) soll dies durch eine Gegenüberstellung des Versuchsablaufs nochmal verdeutlichen.

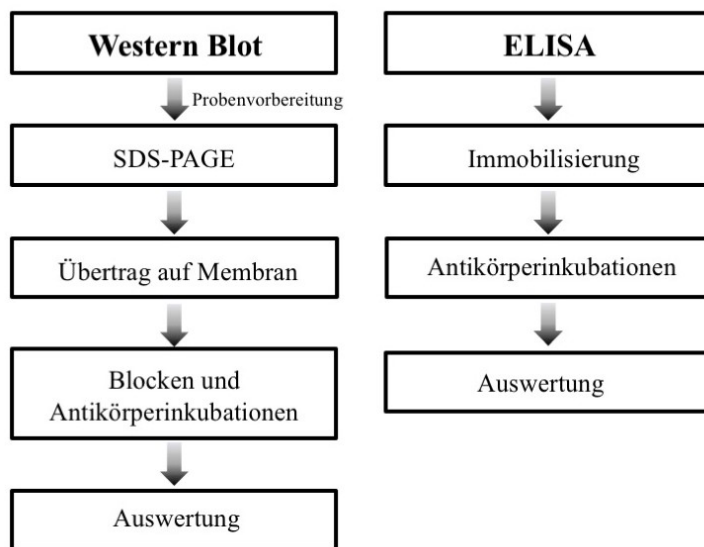


Abbildung 53: Fließschema des Versuchsablaufs der zur Qualitätskontrolle verwendeten Methoden.

Durch das Fließschema wird deutlich, dass der ELISA durch die geringe Anzahl der Schritte und der fehlenden Probenvorbereitung methodische Vorteile hat. Zusätzlich ist der Western Blot eine Kombination zweier molekularbiologischer Methoden und damit anfälliger für Fehler.

Auf Grund der hier beschriebenen Phänomene wird die Notwendigkeit einer stringenten und detaillierten Qualitätskontrolle der Antikörper deutlich. Es muss sichergestellt werden, dass die jeweilige Droge spezifisch anhand ihrer charakteristischen funktionellen Gruppen bzw. Struktur nachgewiesen werden kann. Dies führt allerdings dazu, dass oft eine größere Menge

an Antikörpern getestet werden muss. Im Western Blot konnten $\approx 43\%$ und im ELISA $\approx 36\%$ der überprüften Antikörper für weitere Versuche genutzt werden. Der Aufwand ist charakteristisch für immunologische Methoden, z.B. war in der Studie von Peterson *et al.* [124] die Überprüfung von 25.000 Hybridoma Zelllinien nötig, um 4 spezifische, davon ein hoch affinen, Antikörper zu erhalten.

4.3. Quantifizierung

Für eine Quantifizierung im humanen Serum konnten für die Substanzen Benzoylecgonin, Methadon und MDMA Eichkurven etabliert werden. Damit war es möglich den relevanten Bereich um den jeweiligen vorgeschriebenen Richtwert der GTFCh verlässlich zu quantifizieren. Die Tabelle 17 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Merkmale der Eichkurven.

Tabelle 17: Übersicht der Eigenschaften der Eichkurven für Methadon, MDMA und Benzoylecgonin.

Droge	Richtwert [ng/mL]	Linearer Bereich [ng/mL]	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]	CV [%]	Pearson R
Methadon	50	25 – 125	150	10	4 – 13	0,99
MDMA	25	0 – 250	250	10	2 – 12	0,91 – 0,97
Benzoylecgonin	30	0 – 200	500	10	3 – 15	0,92 – 0,98

Die etablierten Eichkurven ermöglichen eine sichere Quantifizierung von Serumproben im Bereich der geforderten Richtwerte von 25 ng/mL (MDMA) bis 50 ng/mL (Methadon). Die linearen Bereiche und die berechneten Koeffizienten erfüllen u.a. die Richtlinien der GTFCh, welche neben dem Bereich der Eichkurve auch CVs von maximal 15 % bzw. 20 % (in Nähe des Richtwertes) festlegt.

Zur Überprüfung der entwickelten Methode wurden Serumproben vermessen, deren Konzentration durch das LKA Berlin massenspektrometrisch bestimmt wurde. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten ergab Werte von 0,85 für MDMA und 0,93 für Benzoylecgonin. Eine Korrelation für Methadon konnte auf Grund der unterschiedlichen Einheiten der Messungen nicht vorgenommen werden. Nach Vorgabe der GTFCh müssen für die authentischen Proben ($n = 10$) für 90 % der Fälle eine positive Klassifizierung vorgenommen werden. Für MDMA ($n = 12$) konnten $\geq 91\%$, für Benzoylecgonin ($n = 10$) 100 % und für Methadon ($n = 11$) ebenfalls $\geq 91\%$ erreicht werden.

Im Vergleich zu anderen Studien sind die berechneten Koeffizienten und Bestimmungsgrenzen ähnlich. Für Drogennachweise wurden in diesen Publikationen zumeist kommerzielle Kits und Urin als Probenmaterial verwendet [125,126]. Es konnten einzelne Substanzklassen quantitativ mit guten Übereinstimmungen zu GC-MS bestimmt werden. Spiehler *et al.* [127] konnten in einer Studie mit postmortalem entnommenen Blut in einem enzymatischen Immunoassay Substanzklassen mit einer Sensitivität und Spezifität von 99 % bzw. 93 % nachweisen. Dabei wurden Grenzwerte von unter 100 ng/mL erreicht und die Korrelation mit GC-MS betrug ca. 0,9. Lei *et al.* [128] entwickelten einen kompetitiven ELISA, der sehr gut vergleichbar mit den in dieser Arbeit erreichten Ergebnissen ist. Bei einem Nachweis von Cotinin (Abbauprodukt von Nikotin) in Urin konnte mit einer LOD von 0,04 ng/mL und CVs von unter 13 % eine Korrelation mit GC-MS von 0,997 erreicht werden. Andere Anwendungsbeispiele für kompetitive ELISAs zum Nachweis niedermolekulare Substanzen sind die Detektion von Antibiotika in Milch [129–131]. In diesen Studien wurden LODs im unteren ng/mL-Bereich, CVs von unter 20 % und Korrelation mit MS-Messungen von über 0,9 erzielt. Diese Werte sind wieder vergleichbar mit den gezeigten Ergebnissen, jedoch wurde in diesen Arbeiten oft eine Probenvorbereitung vorgenommen und es wurden Kreuzreaktivitäten mit strukturell ähnlichen Substanzen beobachtet. Die erzielten CVs und Detektionslimits bewegen sich weiterhin im selben Bereich von MS-Analysen [132–134]. Diese zeigen jedoch bessere Bestimmungsgrenzen, waren aber anfälliger für Einflüsse des Probenmaterials.

Das folgende Fließschema (Abbildung 54) soll nochmals verdeutlichen, welche Vorteile der ELISA gegenüber MS-basierten Methoden hat.

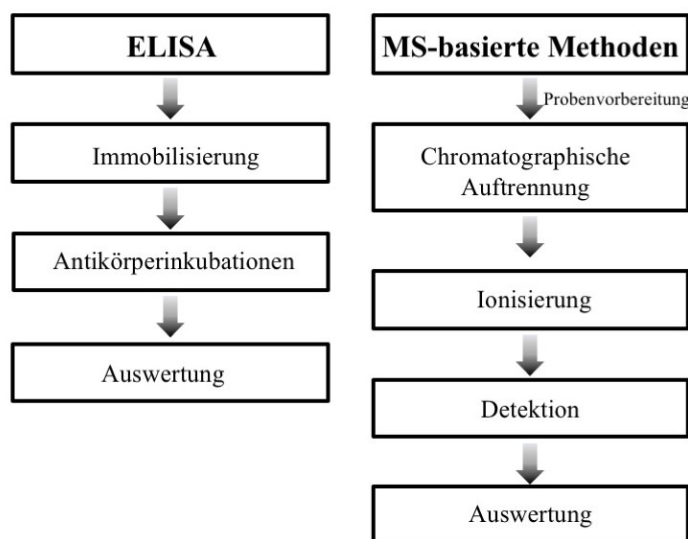


Abbildung 54: Fließschema des Versuchsablaufs der zur Quantifizierung verwendeten Methoden.

Auch hier wird wie zuvor beim Vergleich zum Western Blot (Abbildung 53) deutlich, dass der ELISA gegenüber MS-basierten Methoden weniger Arbeitsschritte und keine Probenvorbereitung benötigt und nur aus einer Methode besteht. Diese Tatsachen begründen die einfache Durchführung und die Robustheit des ELISAs.

Im Vergleich zur verbreiteten Anwendung immunologischer Drogennachweise, den Streifen- bzw. Schnelltests, konnten bessere Nachweisgrenzen erreicht werden [107,135].

Anhand der Ergebnisse und Literaturrecherche wird ein weiteres Mal die Wichtigkeit deutlich, neben Kreuzreaktivitäten [136] auch Einflüsse in der Probenvorbereitung und Unterschiede zwischen mehreren Produktionschargen zu untersuchen [137,138]. Neben unspezifischer Bindungen durch strukturell verwandte Substanzen, wurden auch Kreuzreaktivitäten mit Medikamenten und Nahrungsergänzungsmitteln beobachtet [125]. Dieser Effekt wurde in dieser Arbeit nicht explizit untersucht. Die Ergebnisse der Quantifizierung der LKA Proben reichen nicht für eine Abschätzung des Effektes aus. Konzentrationsunterschiede, die in der Quantifizierung aufgetreten sind, können beim ELISA auf Einflüsse durch nicht identifizierte Kreuzreaktivitäten oder bei GC- bzw. LC-MS Messungen auf Verluste während der Probenvorbereitung und der Chromatographie zurückzuführen sein [139]. Der Einfluss von Methanol konnte jedoch sowohl in dieser Arbeit, als auch in anderen Publikationen beobachtet werden [138,140]. Es wird vermutet, dass das Methanol die Antikörperbindung am Konjugat mindert bzw. als Lösemittel zur Denaturierung der Antikörper führt, was zur beobachteten Signalabnahme mit steigender Methanolmenge (Abbildung 29) geführt haben könnte.

Konsens besteht in der Tatsache, dass die Validierung einer Methode ein kritischer Punkt ist [141]. In Bezug auf Drogennachweis wird u.a. eine Überprüfung mit 2 unabhängigen Methoden (z.B. ELISA und MS-Messungen) empfohlen [142]. Die Nutzung zweier unabhängiger Methoden, die Untersuchung verschiedener Kreuzreaktivitäten, der Vergleich zwischen Puffer und Probenmaterial, die Untersuchung von Lagereffekten und die Durchführung individueller Eichkurven wurden in dieser Arbeit durchgeführt und entsprechen damit nicht nur den Richtlinien der GTFCh und der Bundesärztekammer, sondern ebenso den Anforderungen der FDA für immunologische Methoden [143].

4.4. Multiplexing und Miniaturisierung

Um einen parallelen Nachweis mehrerer Drogen auf einem miniaturisierten Format zu ermöglichen, wurde der ELISA auf einen Microarray übertragen.

Generell lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der ELISAs nicht direkt auf Microarrays übertragen werden können [144]. Daher gilt, dass für jede Plattform der Ansatz etabliert werden

und die jeweiligen Versuchsbedingungen jedes Mal individuell angepasst werden müssen [87,145–147]. Die Verwendung von Microarrays soll v.a. den Durchsatz erhöhen [148] und die Sensitivität verbessern [149]. Aktuell werden parallele Nachweise auf einem Microarray wenig außerhalb von Forschungseinrichtungen verwendet [150].

Eines der wenig vorhandenen kommerziell erhältlichen Systeme, kann über einen Immunoassay in verschiedenen Probenmaterialien Drogen, wie synthetischer Cathinone (Amphetamine) nachweisen [151,152]. Die Übereinstimmung mit ELISAs betrug über 90 %. Jedoch wurden Einflüsse des Probenmaterials auf die Kalibratoren beobachtet. Daher wird dieses Komplettsystem auch nur als Vortest empfohlen. Die Studie von Tort *et al.* [153] für einen Nachweis mehrerer Steroide in Serum, ergab die geforderten Nachweisgrenzen (10 ng/mL) und akzeptable CVs (15 – 25 %). Jedoch wurden Kreuzreaktivitäten zu anderen Steroiden beobachtet und es wurde eine aufwendige Probenvorbereitung durchgeführt.

Der gezeigte Microarray (Abbildung 51) war in der Lage MDMA in Serum nachzuweisen. Die Übereinstimmung zum ELISA betrug 96 %, jedoch lag die LOQ bei 50 ng/mL, was über dem Richtwert von 25 ng/mL lag. Neben der Sensitivität muss der Nachweis weiterer Drogen etabliert werden, um ein Multiplexing zu ermöglichen. Mögliche Versuchsansätze wären eine höhere Immobilisierungskonzentration oder die Erprobung anderer Oberflächenmodifikationen [30]. Du *et al.* [30] veröffentlichten einen Ansatz, der verschiedene Drogen qualitativ ab 1 µg/mL und quantitativ im unteren ng/mL Bereich nachweisen kann. Ob diese Werte auch in einem biologischen Material erreicht werden konnten, ob Kreuzreaktivitäten auftraten oder in welcher Menge die freien Drogen eingesetzt wurden, wurde jedoch nicht beschrieben. Daher ist diese Publikation zunächst als Machbarkeitsstudie anzusehen, die keinen Aufschluss über eine verlässliche Quantifizierung authentischer Proben liefert.

Eine Miniaturisierung kann für die Implementierung in Teststreifen und ähnlichen Testsystemen genutzt werden. Testsysteme die sich Mikrofluidiken bedienen, können z.B. die Antikörperinkubation vereinfachen [154]. Eine Probenvorbereitung wie sie in Publikationen beschrieben wurde [155], ist mit dem hier etablierten Nachweis nicht nötig, könnte aber ebenfalls über eine Fluidik gelöst werden. Durch die Kombination eines Streifentests mit einem Microarray könnte ein paralleler Nachweis mit Möglichkeit zur Quantifizierung bewerkstelligt werden. Ein derartiger Aufbau wurde von Taranova *et al.* [156] in Puffer realisiert.

Die hier beschriebene Kombination mehrerer Techniken gekoppelt mit einem immunologischen Nachweis, können nach entsprechender Validierung ein Testverfahren ermöglichen, was günstig, schnell und mit geringen Verbrauch an Reagenzien und Probe einen verlässlichen sensitiven Nachweis mehrerer Drogen ermöglicht.

5. Schlussfolgerung

Innerhalb der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein sensitiver, spezifischer und robuster Drogennachweis im Serum mittels einem kompetitiven ELISA möglich ist. Dieser Ansatz soll Massenspektrometrie-Messungen keinesfalls ersetzen. Allein durch die Sensitivität und die Anpassungsfähigkeit an neue Substanzen besitzen moderne Massenspektrometrie-Geräte deutliche Vorteile. Die hier gezeigte Quantifizierung ist aber durchaus in der Lage bestehende Verfahren zu ergänzen.

Zusätzlich konnte im Gegensatz zu bestehenden Protokollen eine verlässliche Quantifizierung etabliert werden. Durch den Vergleich mit massenspektrometrischen Messungen konnte bewiesen werden, dass authentische und über einen längeren Zeitraum gelagerte Serumproben über einen immunologischen Nachweis zuverlässig quantifiziert werden können. Der in dieser Arbeit etablierte Nachweis entspricht den gängigen Richtlinien und wurde hochwertig aufgebaut, sodass weder hochkonzentrierte Drogenlösungen, ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern, noch eine längere Lagerung und den eventuell dadurch auftretenden Abbauprodukten einen Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität hatten.

Eine in immunologischen Verfahren zwingende Qualitätskontrolle der Antikörper ist zwar zeitintensiv, führt aber dazu, dass äußerst zuverlässige Analysen durchgeführt werden können. Ein weiterer Vorteil der in dieser Arbeit etablierten Methoden ist die Übersichtlichkeit des Protokolls. Für die Durchführung des ELISAs, werden neben den Referenzmaterialien und der Antikörper nur die gängigsten Laborutensilien, wie eine Mikrotiterplatte und ein Schüttler, verwendet. Durch die gezeigten Versuchsbedingungen können zusätzlich zur Eichgerade bis zu 10 Proben mit unbekannter Drogenkonzentration innerhalb von 3 Stunden untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. BtMG. Betäubungsmittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 1. März 1994 (BGBl. I S. 358), das zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 11. November 2015 (BGBl. I S. 1992) geändert worden ist; **1981**.
2. Mostardt, S.; Flöter, S.; Neumann, A.; Wasem, J.; Pfeiffer-Gerschel, T. Schätzung der Ausgaben der öffentlichen Hand durch den Konsum illegaler Drogen in Deutschland TT - Public Expenditure Caused by the Consumption of Illicit Drugs in Germany. *Gesundheitswesen* **2010**, 72, 886–894.
3. Tenenbein, M. Do you really need that emergency drug screen? *Clin. Toxicol.* **2009**, 47, 286–291.
4. Eisen, J.; Sivilotti, M.; Boyd, K.; et al Screening urine for drugs of abuse in the emergency department: do tests results affect physicians' patient care decisions. *Can J Emerg Med* **2004**, 6, 104–11.
5. Fabbri, A.; Marchesini, G.; Morselli-Labate, A.; Ruggeri, S.; Fallani, M.; Melandri, R.; Bua, V.; Pasquale, A.; Vandelli, A. Comprehensive drug screening in decision making of patients attending the emergency department for suspected drug overdose. *Emerg. Med. J.* **2003**, 20, 25–28.
6. Boyer, E. W.; Shannon, M. W. Which Drug Tests in Medical Emergencies? *Clin. Chem.* **2003**, 49, 353–354.
7. Bundesministerium für Gesundheit Situation des Tabakkonsums in Deutschland <http://www.bmg.bund.de> (accessed Apr 28, **2016**).
8. EMCDDA The European Drug Report 2015, Trends and Developments. *Publ. Off. Eur. Union, Luxemb.* **2015**.
9. Petit, J.; Meurice, N.; Kaiser, C.; Maggiora, G. Softening the Rule of Five—where to draw the line? *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 5343–5351.
10. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615–2623.
11. Viswanadhan, V. N.; Rajesh, H.; Balaji, V. N. Atom Type Preferences, Structural Diversity, and Property Profiles of Known Drugs, Leads, and Nondrugs: A Comparative Assessment. *ACS Comb. Sci.* **2011**, 13, 327–336.
12. Pardridge, W. M. *The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development*; Vol. 2.
13. Thevis, M.; Kuuranne, T.; Geyer, H.; Schänzer, W. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing. *Drug Test. Anal.* **2015**, 7, 1–20.

14. Teale, P.; Scarth, J.; Hudson, S. Impact of the emergence of designer drugs upon sports doping testing. *Bioanalysis* **2011**, *4*, 71–88.
15. Forbes, G. B. The effect of anabolic steroids on lean body mass: The dose response curve. *Metabolism* **1985**, *34*, 571–573.
16. Mercolini, L.; Mandrioli, R.; Sorella, V.; Somaini, L.; Giocondi, D.; Serpelloni, G.; Raggi, M. A. Dried blood spots: Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol and its main metabolites. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1271*, 33–40.
17. ElSohly, M. A.; Stanford, D. F.; Murphy, T. P.; Lester, B. M.; Wright, L. L.; Smeriglio, V. L.; Verter, J.; Bauer, C. R.; Shankaran, S.; Bada², H. S.; Walls, H. C. Immunoassay and GC-MS Procedures for the Analysis of Drugs of Abuse in Meconium. *J. Anal. Toxicol.* **1999**, *23*, 436–445.
18. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. Stryer Biochemistry; 6th ed.; *W. H. Freeman and Company: New York*, **2002**.
19. Lopez-Avila, V. Identification of Designer Drugs using Gas Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry and a Soft-Ionization Source. *J Forensic Sci Criminol* **2013**, *1*, 301.
20. Handbook of Forensic Drug Analysis; Smith, F. P., Ed.; *Elsevier Academic Press*, **2005**.
21. Nelson, D.; Cox, M. Lehninger Biochemie; 3. Auflage.; *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, **2001**.
22. Müller-Esterl, W. Biochemie; *Spektrum Akademischer Verlag*, **2004**.
23. Reid, M. J.; Derry, L.; Thomas, K. V Analysis of new classes of recreational drugs in sewage: Synthetic cannabinoids and amphetamine-like substances. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6*, 72–79.
24. Tassoni, G.; Cippitelli, M.; Ottaviani, G.; Frolidi, R.; Cingolani, M. Detection of Cannabinoids by ELISA and GC–MS Methods in a Hair Sample Previously Used to Detect Other Drugs of Abuse. *J. Anal. Toxicol.* **2015**.
25. Meyer, G. M. J.; Weber, A. A.; Maurer, H. H. Development and validation of a fast and simple multi-analyte procedure for quantification of 40 drugs relevant to emergency toxicology using GC-MS and one-point calibration. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6*, 472–481.
26. Li, G.; Wu, D.; Wang, Y.; Xie, W.; Zhang, X.; Liu, B. Determination of the volatiles from tobacco by capillary gas chromatography with atomic emission detection and mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 334–340.
27. Jafari, M. T.; Saraji, M.; Sherafatmand, H. Design for Gas Chromatography–Corona Discharge–Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10077–10084.

28. Zachariadis, G. A.; Rosenberg, E. Speciation of organotin compounds in urine by GC–MIP–AED and GC–MS after ethylation and liquid–liquid extraction. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 1140–1144.
29. Castaneto, M.; Barnes, A.; Concheiro, M.; Klette, K.; Martin, T.; Huestis, M. Biochip array technology immunoassay performance and quantitative confirmation of designer piperazines for urine workplace drug testing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 4639–4648.
30. Du, H.; Yang, W.; Xing, W.; Su, Y.; Cheng, J. Parallel detection and quantification using nine immunoassays in a protein microarray for drug from serum samples. *Biomed. Microdevices* **2005**.
31. Du, H.; Cheng, J. Protein chips for high-throughput doping screening in athletes. *Expert Rev. Proteomics* **2006**.
32. Murphy, K. Janeway's Immunobiology; 8th ed.; **2011**.
33. Berson, S. A.; Yalow, R. S.; Bauman, A.; Rothschild, M. A.; Newerly, K. Insulin-I(131) Metabolism in Human Subjects: Demonstration of Insulin Binding Globulin in the Circulation of Insulin Treated Subjects . *J. Clin. Invest.* **1956**, *35*, 170–190.
34. Yalow, R. S.; Berson, S. A. Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. *J. Clin. Invest.* **1960**, *39*, 1157–1175.
35. Spector, S.; Parker, C. W. Morphine: Radioimmunoassay. *Science (80-.)*. **1970**, *168*, 1347–1348.
36. Nakane, P. K.; Pierce, G. B. Enzyme-Labeled Antibodies for the Light and Electron Microscopic Localization of Tissue Antigens. *J. Cell Biol.* **1967**, *33*, 307–318.
37. Swortwood, M. J.; Hearn, W. L.; DeCaprio, A. P. Cross-reactivity of designer drugs, including cathinone derivatives, in commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6*, 716–727.
38. Agius, R.; Nadulski, T.; Moore, C. Validation of LUCIO-Direct-ELISA kits for the detection of drugs of abuse in urine: application to the new German driving licence re-granting guidelines. *Forensic Sci. Int.* **2012**, *215*, 38–45.
39. Beck, O.; Rausberg, L.; Al-Saffar, Y.; Villen, T.; Karlsson, L.; Hansson, T.; Helander, A. Detectability of new psychoactive substances, “legal highs”, in CEDIA, EMIT, and KIMS immunochemical screening assays for drugs of abuse. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6*, 492–499.
40. Markway, E.; Baker, S. A Review of the Methods, Interpretation, and Limitations of the Urine Drug Screen. *Orthopedics* **2011**, *1*, 877–881.
41. Baker, H. N.; Murphy, R.; Lopez, E.; Garcia, C. Conversion of a Capture ELISA to a Luminex xMAP Assay using a Multiplex Antibody Screening Method. *J. Vis. Exp.* **2012**,

- 4084.
42. Marsden, C. J.; Eckersley, S.; Hebditch, M.; Kvist, A. J.; Milner, R.; Mitchell, D.; Warwicker, J.; Marley, A. E. The Use of Antibodies in Small-Molecule Drug Discovery. *J. Biomol. Screen.* **2014**, *19*, 829–838.
 43. Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. Der Experimentator: Immunologie; 4. Auflage.; *Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Heidelberg*, **2014**.
 44. Ahmad, K. M.; Oh, S. S.; Kim, S.; McClellen, F. M.; Xiao, Y.; Soh, H. T. Probing the Limits of Aptamer Affinity with a Microfluidic SELEX Platform. *PLoS One* **2011**, *6*, e27051.
 45. Lou, X.; Qian, J.; Xiao, Y.; Viel, L.; Gerdon, A. E.; Lagally, E. T.; Atzberger, P.; Tarasow, T. M.; Heeger, A. J.; Soh, H. T. Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 2989–2994.
 46. McKeague, M.; DeRosa, M. C. Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *J. Nucleic Acids* **2012**, *2012*, 748913.
 47. Bunka, D. H. J.; Stockley, P. G. Aptamers come of age – at last. *Nat Rev Micro* **2006**, *4*, 588–596.
 48. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (Rili-BÄK). *Dtsch Arztebl Int.* **2013**, *110*, 1056.
 49. Peters, F. T.; Hartung, M.; Herbold, M.; Schmitt, G.; Daldrop, T.; Mußhoff, F.; Paul, L. D.; Aebi, B.; Auwärter, V.; Kraemer, T.; Skopp, G. Anhang B, Anforderungen an die Validierung von Analysenmethoden. *Toxichem Krimtech* **2009**, *76*, 185–208.
 50. Paul, L. D.; Mußhoff, F.; Peters, F. T.; Skopp, G.; Krämer, T.; Aebi, B.; Auwärter, V.; Thieme, D.; Schmitt, G.; Herbold, M.; Aderjan, R.; Tönnies, S. Anhang A, Qualitätsanforderungen an die Bestimmung spezieller Analyten aus biologischen Matrices mit Tabellenanhang (aktuelle Vorgaben zu Bestimmungsgrenzen). *Toxichem Krimtech* **2009**, *76*, 177–184.
 51. Biosynex. Drugs of Abuse Testing; **2013**.
 52. StVG. Anlage (zu § 24a); **2007**.
 53. Gilman, A. G.; Goodman, L. S.; Gilman, A. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*; 7th ed.; Macmillan Publishing Co., Inc.: New York, 1985.
 54. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database Amphetamine <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3007> (accessed Feb 24, **2016**).
 55. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database Methamphetamine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1206> (accessed Feb 24,

2016).

56. Green, A. R.; Mehan, A. O.; Elliott, J. M.; O'Shea, E.; Colado, M. I. The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 463–508.
57. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database MDMA <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1615> (accessed Feb 24, **2016**).
58. Grotenhermen, F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 327–360.
59. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database THC <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16078> (accessed Feb 24, **2016**).
60. Rasmussen, S. G. F.; Carroll, F. I.; Maresch, M. J.; Jensen, A. D.; Tate, C. G.; Gether, U. Biophysical Characterization of the Cocaine Binding Pocket in the Serotonin Transporter Using a Fluorescent Cocaine Analogue as a Molecular Reporter. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4717–4723.
61. Volkow, N. D.; Wang, G.-J.; Fischman, M. W.; Foltin, R.; Fowler, J. S.; Franceschi, D.; Franceschi, M.; Logan, J.; Gatley, S. J.; Wong, C.; Ding, Y.-S.; Hitzemann, R.; Pappas, N. Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Sci.* **2000**, *67*, 1507–1515.
62. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database Cocaine <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/446220> (accessed Feb 24, **2016**).
63. Brim, R. L.; Noon, K. R.; Collins, G. T.; Nichols, J.; Narasimhan, D.; Sunahara, R. K.; Woods, J. H. The Ability of Bacterial Cocaine Esterase to Hydrolyze Cocaine Metabolites and Their Simultaneous Quantification Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 1119–1127.
64. Parker, R. B.; Casey Laizure, S. The Effect of Ethanol on Oral Cocaine Pharmacokinetics Reveals an Unrecognized Class of Ethanol-Mediated Drug Interactions. *Drug Metab. Dispos.* **2010**, *38*, 317–322.
65. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database Benzoylecgonine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/448223> (accessed Feb 24, **2016**).
66. Modesto-Lowe, V.; Brooks, D.; Petry, N. *Methadone Deaths: Risk Factors in Pain and Addicted Populations*; 2010; Vol. 25.
67. Kharasch, E. D.; Stubbert, K. Role of cytochrome P4502B6 in methadone metabolism and clearance. *J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *53*, 305–313.

68. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database Methadone <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4095> (accessed Feb 24, **2016**).
69. Ben Haddou, T.; Béni, S.; Hosztafi, S.; Malfacini, D.; Calo, G.; Schmidhammer, H.; Spetea, M. Pharmacological Investigations of N-Substituent Variation in Morphine and Oxymorphone: Opioid Receptor Binding, Signaling and Antinociceptive Activity. *PLoS One* **2014**, *9*, e99231.
70. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database Morphine <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5288826> (accessed Feb 24, **2016**).
71. Hillhouse, T. M.; Porter, J. H.; Negus, S. S. Comparison of antidepressant-like and abuse-related effects of phencyclidine in rats. *Drug Dev. Res.* **2014**, *75*, 479–488.
72. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database PCP <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6468> (accessed Feb 24, **2016**).
73. Nestler, E. J. Molecular mechanisms of drug addiction. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 2439–2450.
74. Kersten, B. P.; McLaughlin, M. E. Toxicology and Management of Novel Psychoactive Drugs. *J. Pharm. Pract.* **2015**, *28*, 50–65.
75. Puighermanal, E.; Busquets-Garcia, A.; Maldonado, R.; Ozaita, A. Cellular and intracellular mechanisms involved in the cognitive impairment of cannabinoids. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *367*, 3254–3263.
76. Dasgupta, A. Beating Drug Tests and Defending Positive Results - A Toxicologist's Perspective; *Humana Press*, **2010**.
77. US Congress; Mice of Technology Assessment; BioZogicaZ. Components of Substance Abuse and Addiction; **1993**.
78. Torres, O. B.; Jalah, R.; Rice, K. C.; Li, F.; Antoline, J. F. G.; Iyer, M. R.; Jacobson, A. E.; Boutaghou, M. N.; Alving, C. R.; Matyas, G. R. *Characterization and optimization of heroin hapten-BSA conjugates: method development for the synthesis of reproducible hapten-based vaccines*; 2014; Vol. 406.
79. Singh, K. V; Kaur, J.; Varshney, G. C.; Raje, M.; Suri, C. R. Synthesis and Characterization of Hapten–Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 168–173.
80. Singh, M. K.; Srivastava, S.; Raghava, G. P. S.; Varshney, G. C. HaptenDB: a comprehensive database of haptens, carrier proteins and anti-hapten antibodies. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 253–255.
81. Jones, L. H. Recent advances in the molecular design of synthetic vaccines. *Nat Chem* **2015**, *7*, 952–960.

82. Eisold, U.; Sellrie, F.; Schenk, J. A.; Lenz, C.; Stöcklein, W. F. M.; Kumke, M. U. Bright or dark immune complexes of anti-TAMRA antibodies for adapted fluorescence-based bioanalysis; **2015**; Vol. 407.
83. Sellrie, F.; Schenk, J. A.; Behrsing, O.; Drechsel, O.; Micheel, B. Cloning and Characterization of a Single Chain Antibody to Glucose Oxidase from a Murine Hybridoma. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *40*, 875–880.
84. Reiss, P. D.; Min, D.; Leung, M. Y. Working towards a consensus for antibody validation. *F1000Research* **2014**, *3*, 266.
85. Prassas, I.; Diamandis, E. P. Translational researchers beware! Unreliable commercial immunoassays (ELISAs) can jeopardize your research. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2014**, *52*, 765.
86. Alvarez, J.-C.; Duverneuil, C.; Zouaoui, K.; Abe, E.; Charlier, P.; de la Grandmaison, G. L.; Grassin-Delyle, S. Evaluation of the first immunoassay for the semi-quantitative measurement of meprobamate in human whole blood or plasma using biochip array technology. *Clin. Chim. Acta* **2012**, *413*, 273–277.
87. Voskuil, J. L. A. Commercial antibodies and their validation. *F1000Research* **2014**, *3*, 232.
88. Juncker, D.; Bergeron, S.; Laforte, V.; Li, H. Cross-reactivity in antibody microarrays and multiplexed sandwich assays: shedding light on the dark side of multiplexing. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 29–37.
89. Gonzalez, R. M.; Seurnyck-Servoss, S. L.; Crowley, S. A.; Brown, M.; Omenn, G. S.; Hayes, D. F.; Zangar, R. C. Development and Validation of Sandwich ELISA Microarrays with Minimal Assay Interference. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 2406–2414.
90. Sambrook, J.; Russell, D. W. Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3. *Hum. Mutat.* **2001**, *18*, 1–2231.
91. Cekan, P.; Jonsson, E. O.; Sigurdsson, S. T. Folding of the cocaine aptamer studied by EPR and fluorescence spectroscopies using the bifunctional spectroscopic probe Ç. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3990–3995.
92. Taghdisi, S. M.; Danesh, N. M.; Nameghi, M. A.; Ramezani, M.; Abnous, K. A label-free fluorescent aptasensor for selective and sensitive detection of streptomycin in milk and blood serum. *Food Chem.* **2016**, *203*, 145–149.
93. Mohammad Danesh, N.; Ramezani, M.; Sarreshtehdar Emrani, A.; Abnous, K.; Taghdisi, S. M. A novel electrochemical aptasensor based on arch-shape structure of aptamer-complimentary strand conjugate and exonuclease I for sensitive detection of streptomycin. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *75*, 123–128.

94. Matsunaga, K.; Kimoto, M.; Hanson, C.; Sanford, M.; Young, H. A.; Hirao, I. Architecture of high-affinity unnatural-base DNA aptamers toward pharmaceutical applications. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18478.
95. Ebrahimi, M.; Johari-Ahar, M.; Hamzeiy, H.; Barar, J.; Mashinchian, O.; Omid, Y. Electrochemical Impedance Spectroscopic Sensing of Methamphetamine by a Specific Aptamer. *Bioimpacts* **2012**, *2*, 91–95.
96. Huang, L.; Yang, X.; Qi, C.; Niu, X.; Zhao, C.; Zhao, X.; Shangguan, D.; Yang, Y. A label-free electrochemical biosensor based on a DNA aptamer against codeine. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *787*, 203–210.
97. Nie, J.; Deng, Y.; Deng, Q.-P.; Zhang, D.-W.; Zhou, Y.-L.; Zhang, X.-X. A self-assemble aptamer fragment/target complex based high-throughput colorimetric aptasensor using enzyme linked aptamer assay. *Talanta* **2013**, *106*, 309–314.
98. Liu, J.; Mazumdar, D.; Lu, Y. A Simple and Sensitive “Dipstick” Test in Serum Based on Lateral Flow Separation of Aptamer-Linked Nanostructures. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 7955–7959.
99. Swensen, J. S.; Xiao, Y.; Ferguson, B. S.; Lubin, A. A.; Lai, R. Y.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W.; Soh, H. T. Continuous, Real-Time Monitoring of Cocaine in Undiluted Blood Serum via a Microfluidic, Electrochemical Aptamer-Based Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4262–4266.
100. Yang, Z.; Castrignanò, E.; Estrela, P.; Frost, C. G.; Kasprzyk-Hordern, B. Community Sewage Sensors towards Evaluation of Drug Use Trends: Detection of Cocaine in Wastewater with DNA-Directed Immobilization Aptamer Sensors. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21024.
101. Han, K.; Liang, Z.; Zhou, N. Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors. *Sensors (Basel)*. **2010**, *10*, 4541–4557.
102. Thiviyanathan, V.; Gorenstein, D. G. Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* **2012**, *6*, 563–573.
103. Omi, K.; Ando, T.; Sakyu, T.; Shirakawa, T.; Uchida, Y.; Oka, A.; Ise, N.; Aoyagi, K.; Goishi, K. Noncompetitive Immunoassay Detection System for Haptens on the Basis of Antimetatype Antibodies. *Clin. Chem.* **2015**, *61*, 627–635.
104. Musshoff, F.; Wolters, T.; Lott, S.; Ippisch, J.; Gradl, S.; Madea, B. Optimization and validation of CEDIA drugs of abuse immunoassay tests in serum and urine on an Olympus AU 400. *Drug Test. Anal.* **2013**, *5*, 366–371.
105. Wille, S. M. R.; Di Fazio, V.; Toennes, S. W.; van Wel, J. H. P.; Ramaekers, J. G.; Samyn, N. Evaluation of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol detection using DrugWipe5S® screening and oral

- fluid quantification after QuantisalTM collection for roadside drug detection via a controlled study with chronic cannabis users. *Drug Test. Anal.* **2015**, *7*, 178–186.
106. Agius, R.; Nadulski, T. Utility of ELISA screening for the monitoring of abstinence from illegal and legal drugs in hair and urine. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6*, 101–109.
 107. Howard Taylor, E.; Pizzo, P. Evaluation of the DrugCheck® 9 On-Site Immunoassay Test Cup According to a Standard Method Validation Protocol. *J. Anal. Toxicol.* **2004**, *28*, 190–197.
 108. Bertol, E.; Vaiano, F.; Furlanetto, S.; Mari, F. Cross-reactivities and structure–reactivity relationships of six benzodiazepines to EMIT® immunoassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *84*, 168–172.
 109. Ghosh, R.; Gilda, J. E.; Gomes, A. V The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev. Proteomics* **2014**, *11*, 549–560.
 110. Humphries, J. M.; Penno, M. A. S.; Weiland, F.; Klingler-Hoffmann, M.; Zuber, A.; Boussioutas, A.; Ernst, M.; Hoffmann, P. Identification and validation of novel candidate protein biomarkers for the detection of human gastric cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2014**, *1844*, 1051–1058.
 111. Mielenz, M.; Mielenz, B.; Singh, S. P.; Kopp, C.; Heinz, J.; Häussler, S.; Sauerwein, H. Development, validation, and pilot application of a semiquantitative Western blot analysis and an ELISA for bovine adiponectin. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2013**, *44*, 121–130.
 112. Schoenherr, R. M.; Saul, R. G.; Whiteaker, J. R.; Yan, P.; Whiteley, G. R.; Paulovich, A. G. Anti-Peptide Monoclonal Antibodies Generated for Immuno-Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry Assays Have a High Probability of Supporting Western blot and ELISA. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14*, 382–398.
 113. Peterson, E. C.; Hambuchen, M. D.; Tawney, R. L.; Gunnell, M. G.; Cowell, J. L.; Lay, J. O.; Blough, B. E.; Carroll, F. I.; Owens, S. M. Simple Radiometric Method for Accurately Quantitating Epitope Densities of Hapten–Protein Conjugates with Sulfhydryl Linkages. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 2112–2115.
 114. Apollonio, L. G.; Whittall, I. R.; Pianca, D. J.; Kyd, J. M.; Maher, W. A. Matrix Effect and Cross-Reactivity of Select Amphetamine-Type Substances, Designer Analogues, and Putrefactive Amines using the Bio-Quant Direct ELISA Presumptive Assays for Amphetamine and Methamphetamine. *J. Anal. Toxicol.* **2007**, *31*, 208–213.
 115. Kemp, P.; Sneed, G.; Kupiec, T.; Spiehler, V. Validation of a Microtiter Plate ELISA for Screening of Postmortem Blood for Opiates and Benzodiazepines. *J. Anal. Toxicol.* **2002**, *26*, 504–512.

116. Jatlow, P. Cocaine: analysis, pharmacokinetics, and metabolic disposition. *Yale J. Biol. Med.* **1988**, *61*, 105–113.
117. Shen, T.; Hof, L. M.; Hausmann, H.; Stadler, M.; Zorn, H.; Allbutt, A. D.; Ayer, W. A.; Brodie, H. J.; Johri, B. N.; Taube, H. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for detection of cyathane diterpenoids Cyathin, a new antibiotic complex produced by *Cyathus helenae*. *BMC Biotechnol.* **2014**, *14*, 1–10.
118. Kuhne, M.; Dippong, M.; Flemig, S.; Hoffmann, K.; Petsch, K.; Schenk, J. A.; Kunte, H.-J.; Schneider, R. J. Comparative characterization of mAb producing hapten-specific hybridoma cells by flow cytometric analysis and ELISA. *J. Immunol. Methods* **2014**, *413*, 45–56.
119. Moreno, A. Y.; Mayorov, A. V.; Janda, K. D. The Impact of Distinct Chemical Structures for the Development of a Methamphetamine Vaccine. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6587–6595.
120. Carroll, F. I.; Blough, B. E.; Pidaparathi, R. R.; Abraham, P.; Gong, P. K.; Deng, L.; Huang, X.; Gunnell, M.; Lay, J. O.; Peterson, E. C.; Owens, S. M. Synthesis of Mercapto (+) methamphetamine Haptens and Their Use for Obtaining Improved Epitope Density on (+) Methamphetamine Conjugate Vaccines. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5221–5228.
121. Carroll, F. I.; Abraham, P.; Gong, P. K.; Pidaparathi, R. R.; Blough, B. E.; Che, Y.; Hampton, A.; Gunnell, M.; Lay, J. O.; Peterson, E. C.; Owens, S. M. The Synthesis of Haptens and Their Use for the Development of Monoclonal Antibodies for Treating Methamphetamine Abuse. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7301–7309.
122. Hambuchen, M. D.; Carroll, F. I.; Rüedi-Bettschen, D.; Hendrickson, H. P.; Hennings, L. J.; Blough, B. E.; Brieady, L. E.; Pidaparathi, R. R.; Owens, S. M. Combining Active Immunization with Monoclonal Antibody Therapy to Facilitate Early Initiation of a Long-acting Anti-methamphetamine Antibody Response. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4665–4677.
123. Pauly, D.; Hanack, K. How to avoid pitfalls in antibody use. *F1000Research* **2015**, *4*, 691.
124. Peterson, E. C.; Gunnell, M.; Che, Y.; Goforth, R. L.; Carroll, F. I.; Henry, R.; Liu, H.; Owens, S. M. Using Hapten Design to Discover Therapeutic Monoclonal Antibodies for Treating Methamphetamine Abuse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322*, 30–39.
125. Shindelman, J.; Mahal, J.; Hemphill, G.; Pizzo, P.; Coty, W. A. Development and Evaluation of an Improved Method for Screening of Amphetamines. *J. Anal. Toxicol.* **1999**, *23*, 506–510.
126. Holler, J. M.; Bosy, T. Z.; Klette, K. L.; Wiegand, R.; Jemionek, J.; Jacobs, A. Comparison of the Microgenics CEDIA® Heroin Metabolite (6-AM) and the Roche Abuscreen®

- ONLINE Opiate Immunoassays for the Detection of Heroin Use in Forensic Urine Samples. *J. Anal. Toxicol.* **2004**, *28*, 489–493.
127. Spiehler, V. R.; Collison, I. B.; Sedgwick, P. R.; Perez, S. L.; Le, S. D.; Farnin, D. A. Validation of an Automated Microplate Enzyme Immunoassay for Screening of Postmortem Blood for Drugs of Abuse. *J. Anal. Toxicol.* **1998**, *22*, 573–579.
128. Lei, Y.; Zhang, Q.; Fang, L.; Akash, M. S. H.; Rehman, K.; Liu, Z.; Shi, W.; Chen, S. Development and comparison of two competitive ELISAs for estimation of cotinine in human exposed to environmental tobacco smoke. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6*, 1020–1027.
129. Jiang, W.; Zhang, H.; Li, X.; Liu, X.; Zhang, S.; Shi, W.; Shen, J.; Wang, Z. Monoclonal Antibody Production and the Development of an Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Screening Spiramycin in Milk. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10925–10931.
130. Huang, B.; Yin, Y.; Lu, L.; Ding, H.; Wang, L.; Yu, T.; Zhu, J.; Zheng, X.; Zhang, Y. Preparation of high-affinity rabbit monoclonal antibodies for ciprofloxacin and development of an indirect competitive ELISA for residues in milk. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2010**, *11*, 812–818.
131. Wang, Z.; Mi, T.; Beier, R. C.; Zhang, H.; Sheng, Y.; Shi, W.; Zhang, S.; Shen, J. Hapten synthesis, monoclonal antibody production and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for erythromycin in milk. *Food Chem.* **2015**, *171*, 98–107.
132. Lin, H.-R.; Chen, C.-L.; Huang, C.-L.; Chen, S.-T.; Lua, A.-C. Simultaneous determination of opiates, methadone, buprenorphine and metabolites in human urine by superficially porous liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2013**, *925*, 10–15.
133. de Jager, A. D.; Bailey, N. L. Online extraction LC–MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: Amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 2642–2652.
134. Coles, R.; Kushnir, M. M.; Nelson, G. J.; McMillin, G. A.; Urry, F. M. Simultaneous Determination of Codeine, Morphine, Hydrocodone, Hydromorphone, Oxycodone, and 6-Acetylmorphine in Urine, Serum, Plasma, Whole Blood, and Meconium by LC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* **2007**, *31*, 1–14.
135. Attema-de Jonge, M. E.; Peeters, S. Y. G.; Franssen, E. J. F. Performance of Three Point-of-care Urinalysis Test Devices for Drugs of Abuse and Therapeutic Drugs Applied in the

- Emergency Department. *J. Emerg. Med.* **2012**, *42*, 682–691.
136. Tate, J.; Ward, G. Interferences in Immunoassay. *Clin. Biochem. Rev.* **2004**, *25*, 105–120.
137. Mockus, L.; Peterson, J. J.; Lainez, J. M.; Reklaitis, G. V Batch-to-Batch Variation: A Key Component for Modeling Chemical Manufacturing Processes. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 908–914.
138. Edupuganti, S. R.; Edupuganti, O. P.; Hearty, S.; O’Kennedy, R. A highly stable, sensitive, regenerable and rapid immunoassay for detecting aflatoxin B1 in corn incorporating covalent AFB1 immobilization and a recombinant Fab antibody. *Talanta* **2013**, *115*, 329–335.
139. Taran, F.; Frobert, Y.; Créminon, C.; Grassi, J.; Olichon, D.; Mioskowski, C.; Pradelles, P. Competitive enzyme immunoassay with monoclonal antibody for homovanillic acid measurement in human urine samples. *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 363–368.
140. Skládal, P. Effect of methanol on the interaction of monoclonal antibody with free and immobilized atrazine studied using the resonant mirror-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 257–263.
141. Kraemer, T.; Paul, L. D. Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in blood; **2007**; Vol. 388.
142. Souza, G. F. de; Carvalho, D.; Pedrosa, W.; Franck, J.; Piarroux, R. Analytical validation of anti-toxoplasma IgG immunoassays. *Brazilian J. Infect. Dis.* **2012**, *16*, 574–576.
143. FDA Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. **2001**.
144. Oswald, S.; Karsunke, X. Y. Z.; Dietrich, R.; Märtilbauer, E.; Niessner, R.; Knopp, D. Automated regenerable microarray-based immunoassay for rapid parallel quantification of mycotoxins in cereals; **2013**; Vol. 405.
145. Lee, J.-R.; Magee, D. M.; Gaster, R. S.; LaBaer, J.; Wang, S. X. Emerging Protein Array Technologies for Proteomics. *Expert Rev. Proteomics* **2013**, *10*, 65–75.
146. Köhler, K.; Seitz, H. Validation Processes of Protein Biomarkers in Serum—A Cross Platform Comparison. *Sensors (Basel)*. **2012**, *12*, 12710–12728.
147. Cretich, M.; Damin, F.; Chiari, M. Protein microarray technology: how far off is routine diagnostics? *Analyst* **2014**, *139*, 528–542.
148. Mendoza, L.; McQuary, P.; Mongan, A.; Gangadharan, R.; Brignac, S.; Eggers, M. High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biotechniques* **1999**, *27*, 778–780.
149. El Khoury, G.; Laurenceau, E.; Chevolot, Y.; Mérieux, Y.; Desbos, A.; Fabien, N.; Rigal, D.; Souteyrand, E.; Cloarec, J.-P. Development of miniaturized immunoassay: Influence of

- surface chemistry and comparison with enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot. *Anal. Biochem.* **2010**, *400*, 10–18.
150. Ellington, A. A.; Kullo, I. J.; Bailey, K. R.; Klee, G. G. Antibody-Based Protein Multiplex Platforms: Technical and Operational Challenges. *Clin. Chem.* **2010**, *56*, 186–193.
151. Ellefsen, K. N.; Anizan, S.; Castaneto, M. S.; Desrosiers, N. A.; Martin, L. T. C. T. M.; Klette, C. K. L.; Huestis, M. A. Validation of the Only Commercially Available Immunoassay for Synthetic Cathinones in Urine: Randox Drugs of Abuse V Biochip Array Technology. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6*, 728–738.
152. Marin, S. J.; Merrell, M.; McMillin, G. A. Drugs of Abuse Detection in Meconium: A Comparison Between ELISA and Biochip Microarray. *J. Anal. Toxicol.* **2011**, *35*, 40–45.
153. Tort, N.; Salvador, J.-P.; Marco, M.-P. *Multiplexed immunoassay to detect anabolic androgenic steroids in human serum*; 2012; Vol. 403.
154. Al-Hetlani, E. Forensic drug analysis and microfluidics. *Electrophoresis* **2013**, *34*, 1262–1272.
155. Toubou, H.; Namera, A.; Arima, Y.; Uchida, Y.; Torikoshi, A.; Moriya, F.; Nagao, M. Detection of abused drugs in human blood by using the on-site drug-screening device Oratect® III. *Leg. Med.* **2014**, *16*, 308–313.
156. Taranova, N. A.; Byzova, N. A.; Zaiko, V. V.; Starovoitova, T. A.; Vengerov, Y. Y.; Zherdev, A. V.; Dzantiev, B. B. *Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: application to the determination of drugs of abuse*; 2013; Vol. 180.

7. Anhang

7.1. Alternative Versuchsansätze zum Drogennachweis

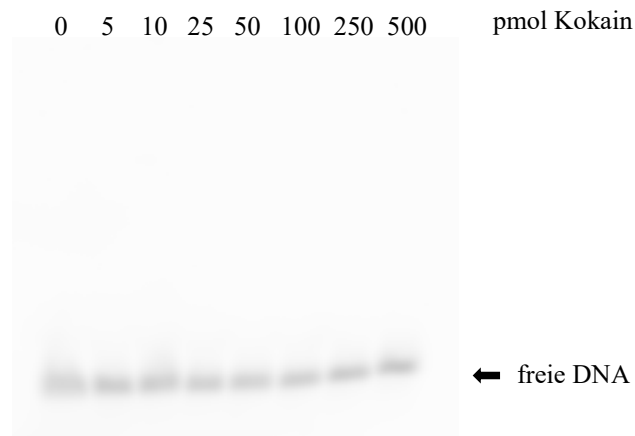


Abbildung 55: Ergebnis eines Nachweises von Kokain über das Aptamer II (5'-6FAM-AAG GAA AAT CCT TCA ATG AAG TGG GTC TCC). 5 pmol des Aptamers wurden mit steigenden Mengen freien Kokains inkubiert bis ein Verhältnis von 1:100 erreicht war. Das Agarosegel wurde nachträglich mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt.

7.2. Qualitätskontrolle der Antikörper

7.2.1. SDS-PAGE und Western Blot

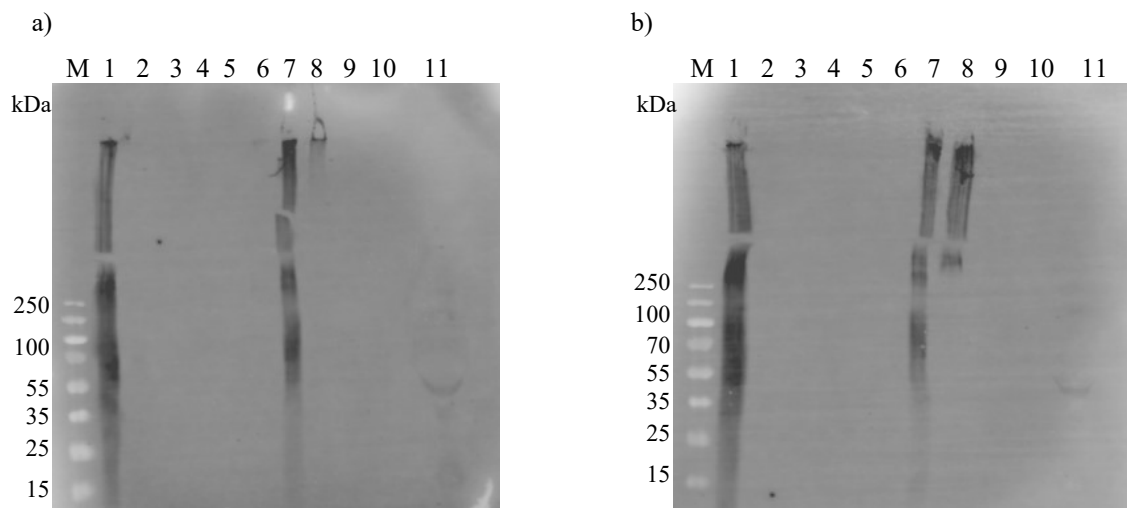


Abbildung 56: Ergebnisse eines Western Blots zum Nachweis des Amphetamin-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper A1 und b) mit dem Antikörper A2. M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoyllecgonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamin-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = BSA; 11 = Serum (1:10). Es wurden 300 ng pro Spur aufgetragen.

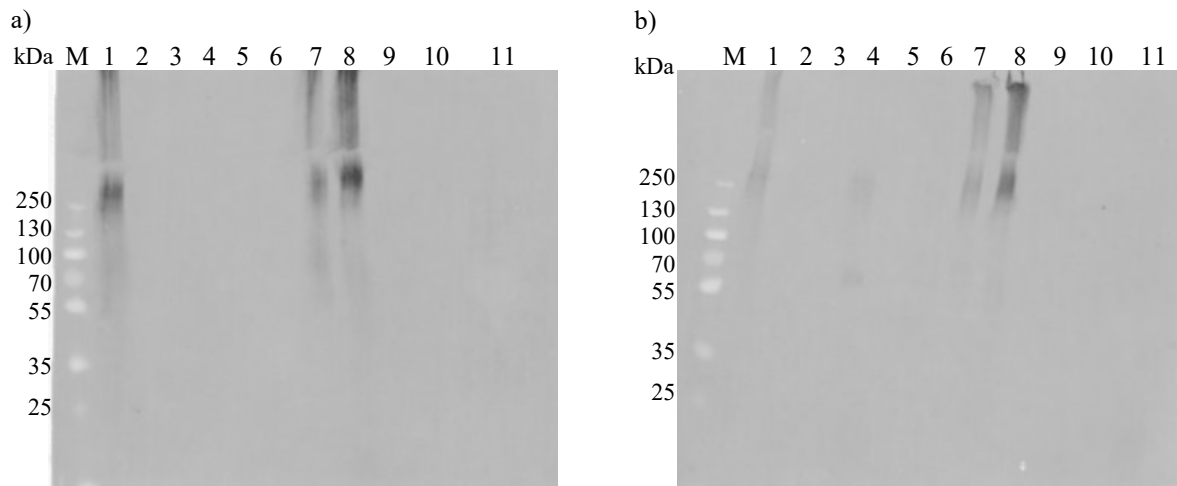


Abbildung 57: Ergebnisse eines Western Blots zum Nachweis des Methamphetamine-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper Me1 und b) mit dem Antikörper Me2. M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoylcegonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamine-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = BSA; 11 = Serum (1:10). Es wurden 300 ng pro Spur aufgetragen.

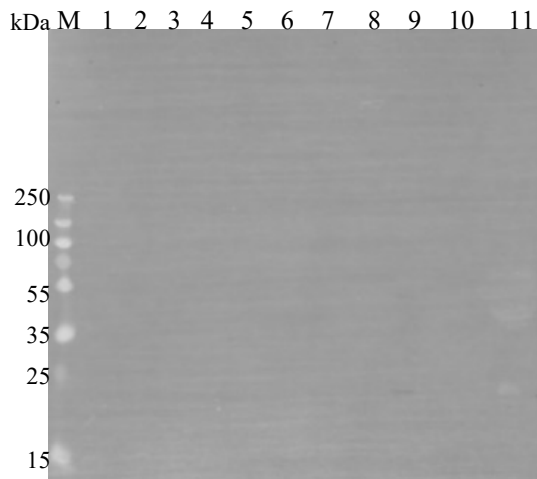


Abbildung 58: Ergebnisse eines Western Blots zum Nachweis des Methamphetamine-BSA Konjugats mit dem Antikörper Me3. M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoylcegonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamine-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = BSA; 11 = Serum (1:10). Es wurden 300 ng pro Spur aufgetragen.

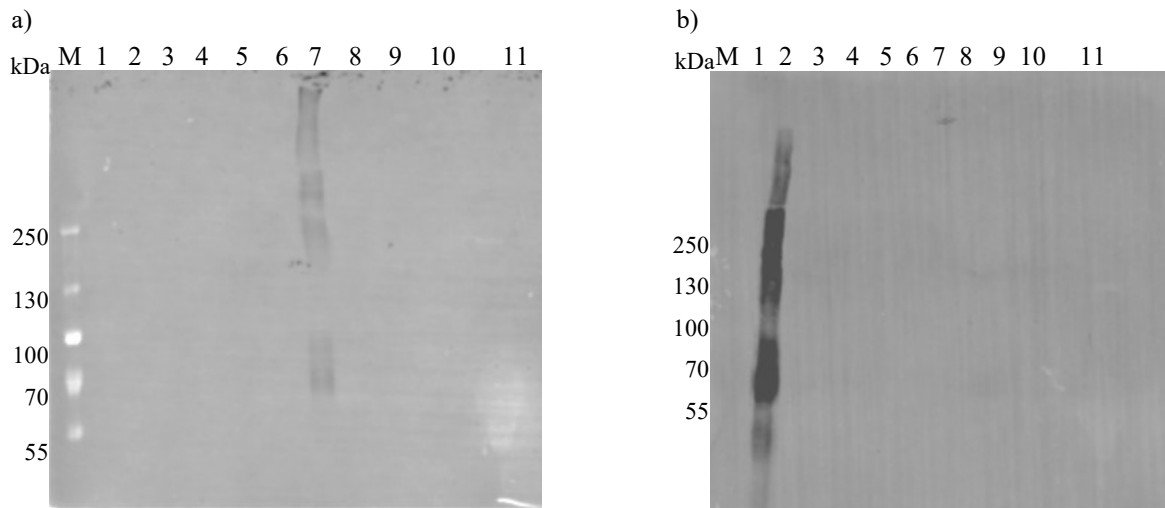


Abbildung 59: Ergebnisse eines Western Blots zum Nachweis des a) MDMA-BSA Konjugats mit dem Antikörper MD1 und b) Methadon-BSA Konjugats mit dem Antikörper Mt1. M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoylcegonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamin-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = BSA; 11 = Serum (1:10). Es wurden 300 ng pro Spur aufgetragen.

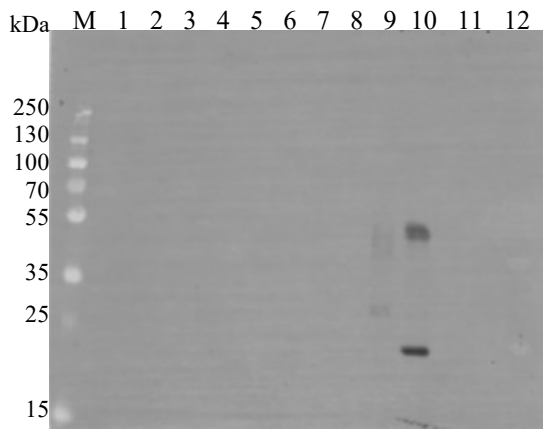


Abbildung 60: Ergebnisse eines Western Blots zum Nachweis des PCP-BSA Konjugats mit dem Antikörper P2. M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoylcegonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamin-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = PCP-AK; 11 = BSA; 12 = Serum (1:10). Es wurden 300 ng pro Spur aufgetragen.

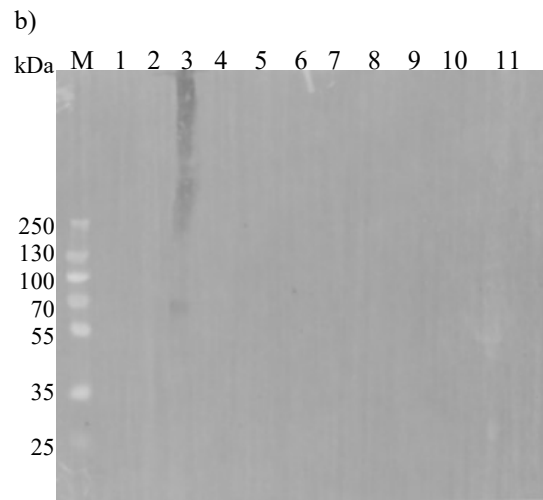
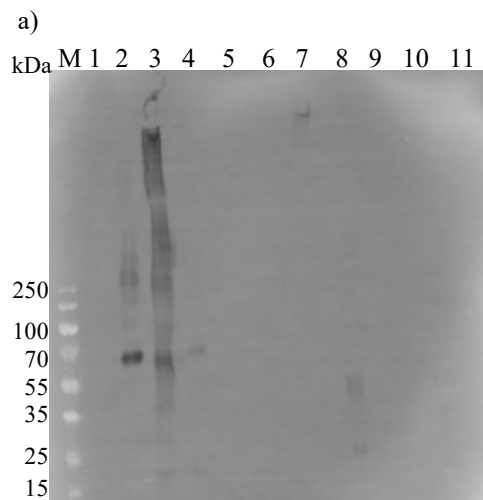


Abbildung 61: Ergebnisse eines Western Blots zum Nachweis des Morphin-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper Mo2 und b) mit dem Antikörper Mo3. M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoyllecgonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamin-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = BSA; 11 = Serum (1:10). Es wurden 300 ng pro Spur aufgetragen.

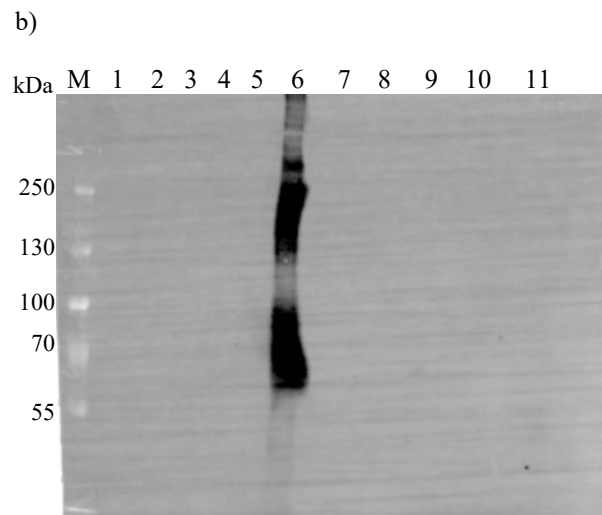
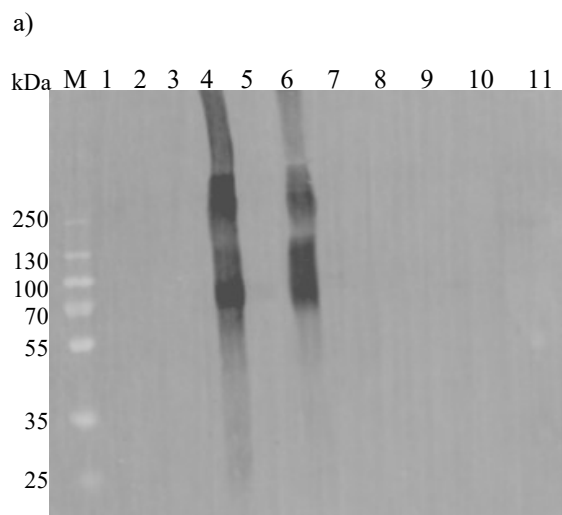


Abbildung 62: Ergebnisse eines Western Blots zum Nachweis des a) Kokain-BSA Konjugats mit dem Antikörper K1 und b) Benzoyllecgonin-BSA Konjugats mit dem Antikörper B1. M = Marker; 1 = Amphetamin-BSA; 2 = Methadon-BSA; 3 = Morphin-BSA; 4 = Kokain-BSA; 5 = THC-BSA; 6 = Benzoyllecgonin-BSA; 7 = MDMA-BSA; 8 = Methamphetamin-BSA; 9 = PCP-BSA; 10 = BSA; 11 = Serum (1:10). Es wurden 300 ng pro Spur aufgetragen.

7.2.2. ELISA

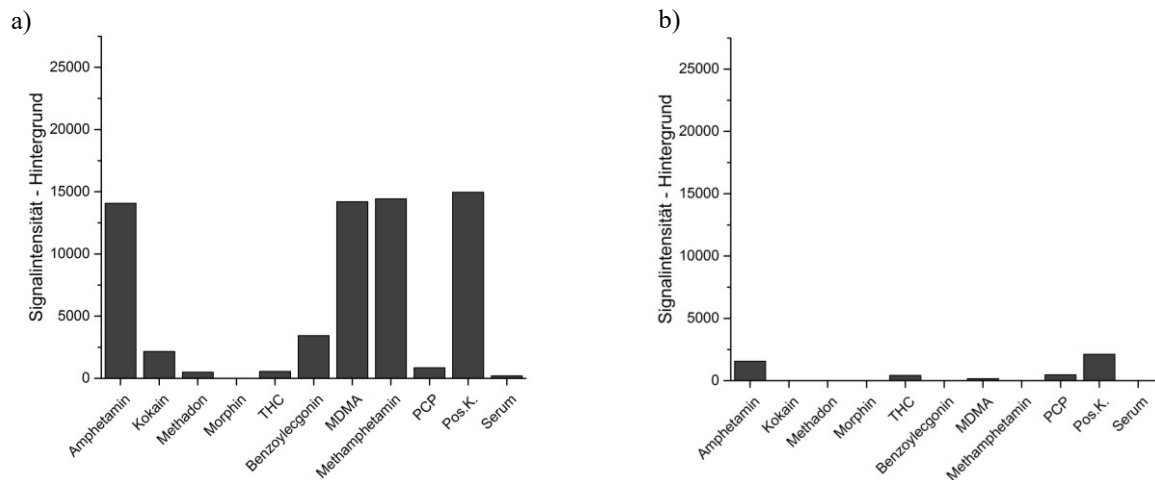


Abbildung 63: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des Amphetamin-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper A2 und b) mit dem Antikörper A3. Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

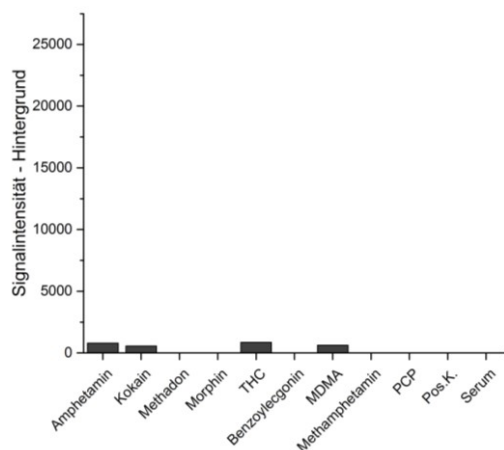


Abbildung 64: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des Amphetamin-BSA Konjugats mit dem Antikörper A4. Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

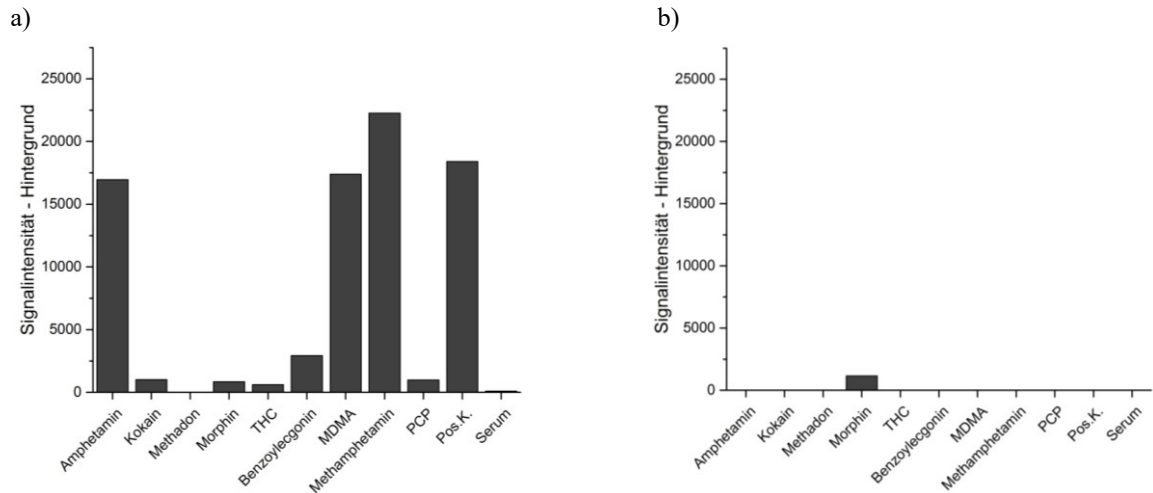


Abbildung 65: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des Methamphetamine-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper Me1 und b) mit dem Antikörper Me4 (1:500). Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

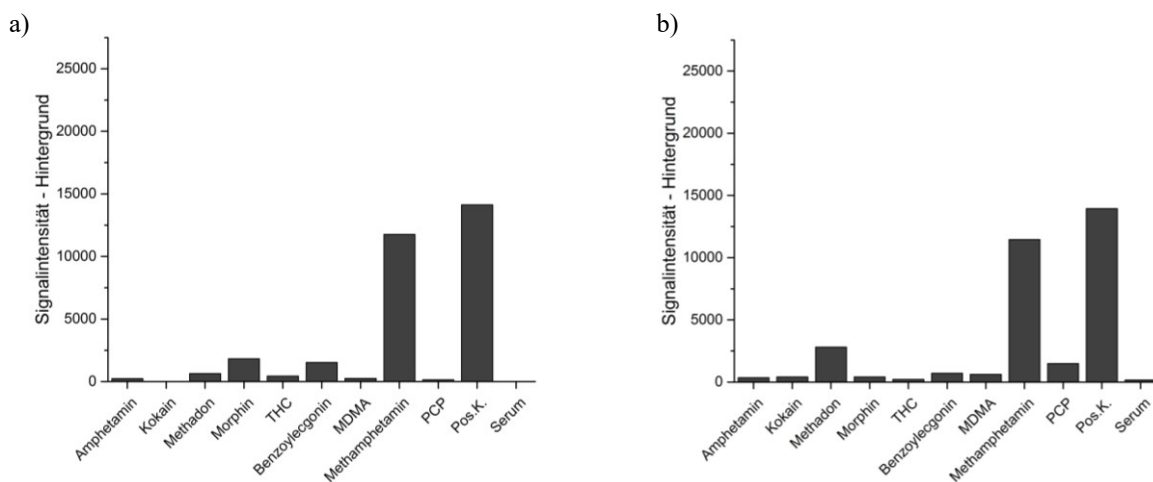


Abbildung 66: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des Methamphetamine-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper Me5 und b) mit dem Antikörper Me6. Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

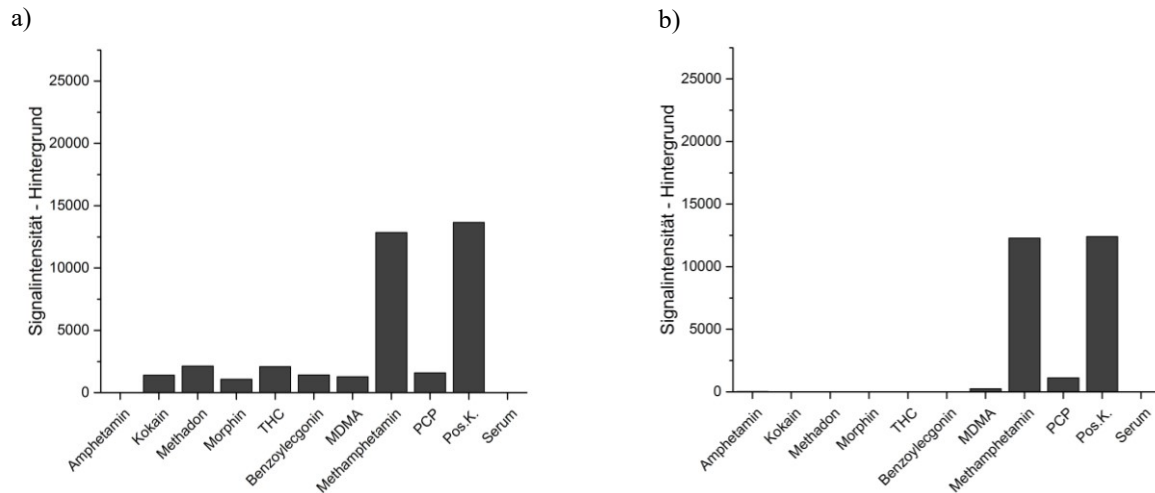


Abbildung 67: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des Methamphetamine-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper Me7 und b) mit dem Antikörper Me8 (1:500). Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

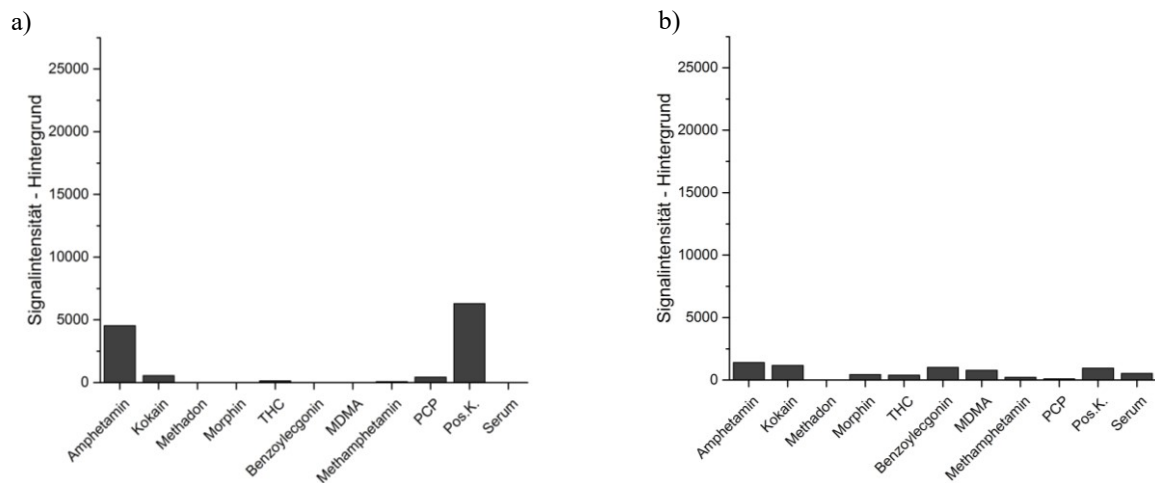


Abbildung 68: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des Methamphetamine-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper Me9 (1:500) und b) mit dem Antikörper Me10. Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und der sekundäre Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

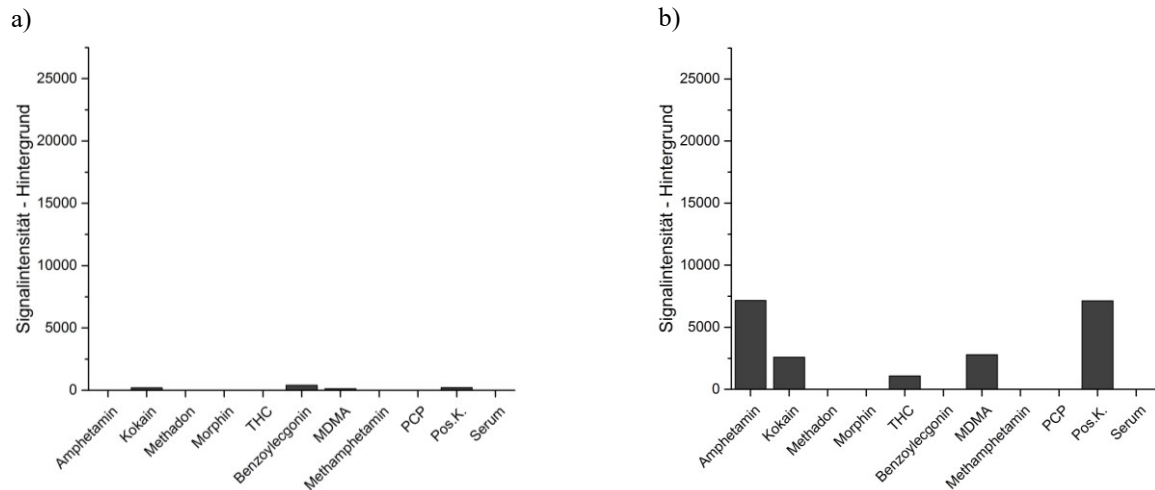


Abbildung 69: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des Methamphetamine-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper Me11 (1:500) und b) mit dem Antikörper Me12. Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und der sekundäre Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

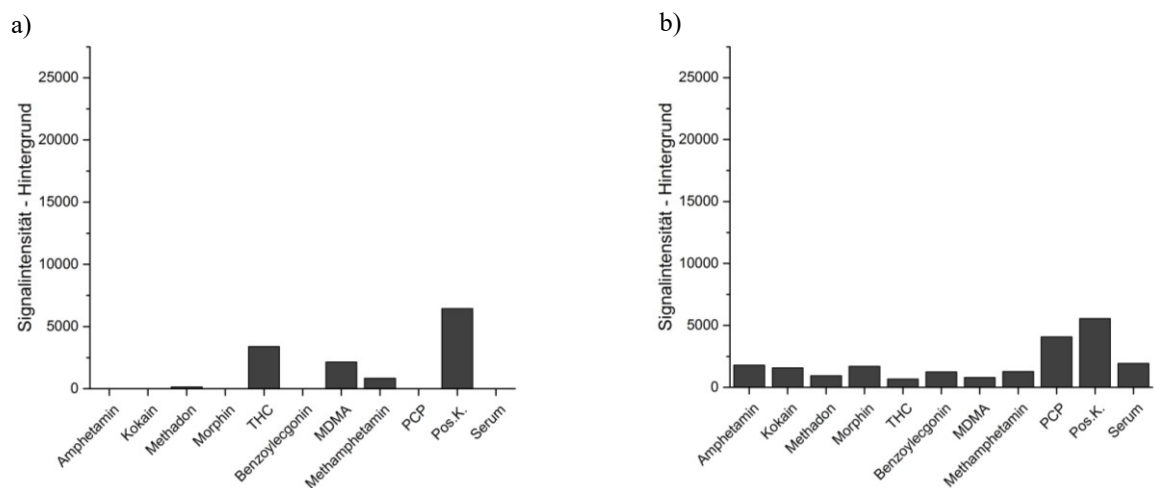
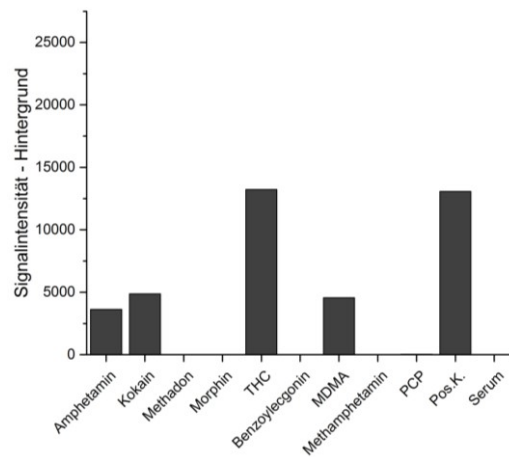


Abbildung 70: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis a) des MDMA-BSA Konjugats mit dem Antikörper MD1 und b) des PCP-BSA Konjugats mit dem Antikörper P2. Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

a)



b)

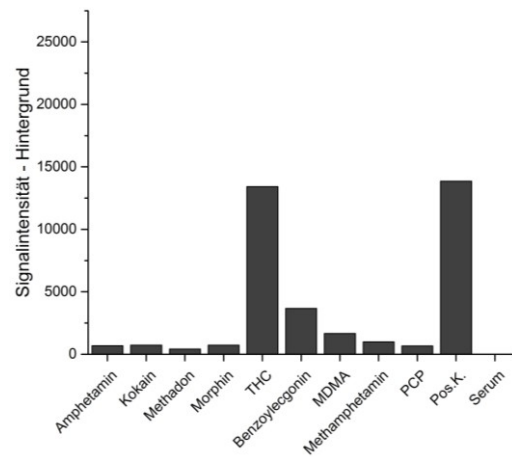


Abbildung 71: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des THC-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper T1 und b) mit dem Antikörper T2. Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

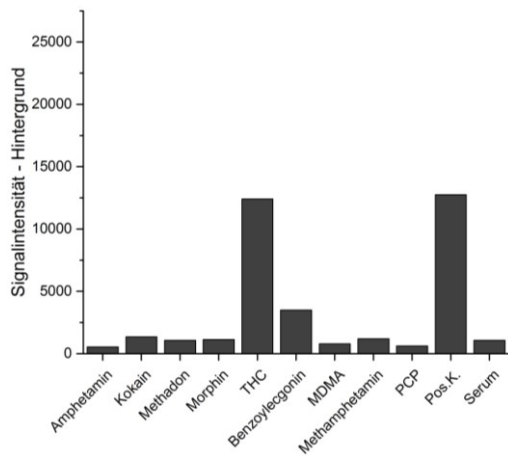


Abbildung 72: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des THC-BSA Konjugats mit dem Antikörper T3. Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

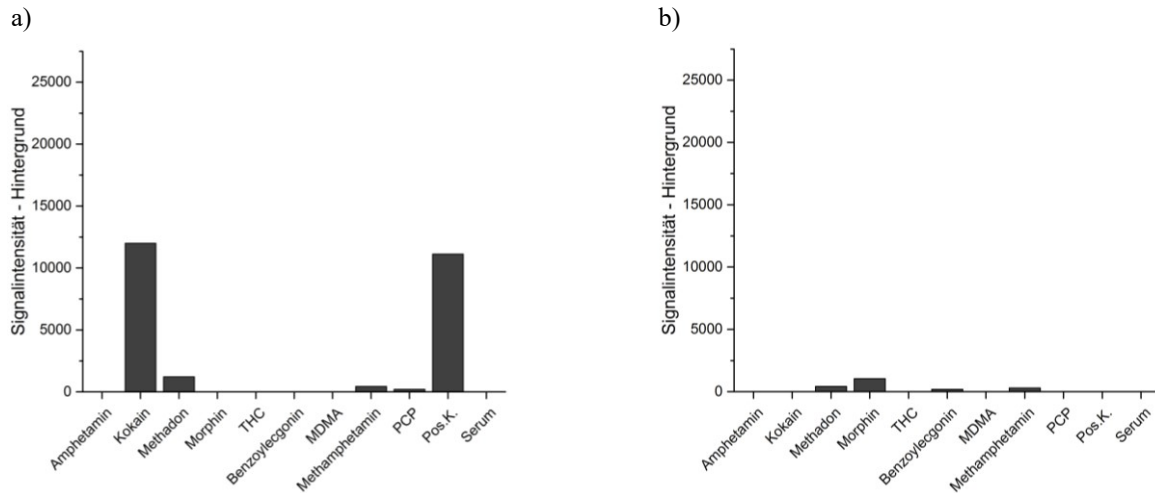


Abbildung 73: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des Kokain-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper K3 (1:500) und b) mit dem Antikörper K4 (1:250). Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und der sekundäre Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

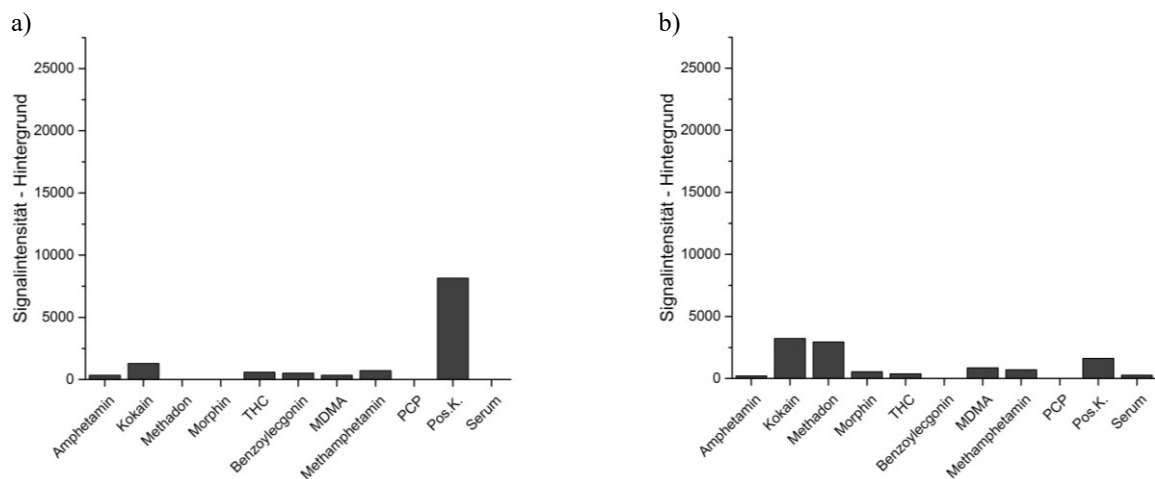


Abbildung 74: Ergebnis eines ELISAs zum Nachweis des Kokain-BSA Konjugats a) mit dem Antikörper K5 (1:500) und b) mit dem Antikörper K6. Die Drogen-BSA Konjugate und die Positivkontrolle (primärer Antikörper) wurden mit jeweils 500 ng immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde Serum verwendet. Die Oberfläche wurde mit 2 % BSA blockiert und die beiden Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt.

7.3. Miniaturisierung des Versuchsaufbaus auf Microarrays

7.3.1. Überprüfung der Funktionalität der Antikörper

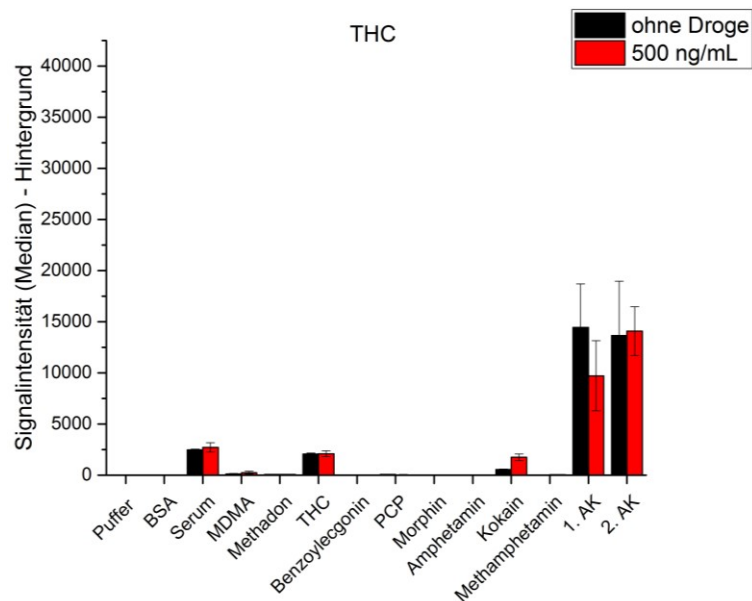


Abbildung 75: Ergebnis eines Microarrays für THC mit dem Antikörper T1. Es wurde 100 ng/mL des THC-BSA Konjugats immobilisiert. Anschließend wurde ein Blockierschritt mit 2 % BSA durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem in Serum angesetzten primären Antikörper (1:100) folgte die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1:1.000). Es wurde ein direkter Nachweis (schwarz) und ein kompetitiver Ansatz (rot) durchgeführt. Kompetitiv wurde 500 ng/mL THC eingesetzt. Die Auswertung der Spots erfolgte mit GenePix Pro 7. Von den Replikaten aus einem Versuch wurde der Median gebildet und davon der lokale Hintergrund abgezogen. Aus den Messwerten wurde die Standardabweichung gebildet.